

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
İMMÜNO-HEMATOLOĞİ BİLİM DALI**

**BOR BİLEŞİKLERİNİN LÖSEMİ HÜCRELERİNE VE
NORMAL LENFOSİTLERE OLAN ETKİSİNİN HÜCRE
KÜLTÜRÜNDE VE TRANSMİŐİON (GEÇİRİMLİ) ELEKTRON
MİKROSKOBUNDA İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zerrin CANTÜRK

TEZ DANIŐMANI

Prof. Dr. Zafer GÜLBAŞ

HAZİRAN-2007

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
İMMÜNO-HEMATOLOJİ BİLİM DALI**

**BOR BİLEŞİKLERİNİN LÖSEMİ HÜCRELERİNE VE
NORMAL LENFOSİTLERE OLAN ETKİSİNİN HÜCRE
KÜLTÜRÜNDE VE TRANSMİSSİON (GEÇİRİMLİ) ELEKTRON
MİKROSKOBUNDA İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zerrin CANTÜRK


TEZ DANIŐMANI


Prof. Dr. Zafer GÜLBAŞ

KABUL VE ONAY SAYFASI

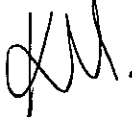
Zerrin CANTÜRK'ün Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı “Bor Bileşiklerinin Lösemi Hücrelerine ve Normal Lenfositlere Olan Etkisinin Hücre Kültüründe ve Transmission (Geçirimli) Elektron Mikroskopunda İncelenmesi” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “KABUL” edilmiştir.

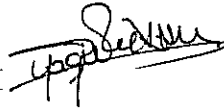
11.06.2007

Üye: Prof.Dr.Zafer GÜLBAŞ 

Üye: Prof.Dr.Kevser EROL 

Üye: Prof.Dr.Sevilhan ARTAN 

Üye: Prof.Dr.Kubilay UZUNER 

Üye: Doç.Dr.Yağmur TUNALI 

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/06/2007.. tarih ve 702./2264.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof.Dr.Ferruh YÜCEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Son yıllarda malignansiler üzerine etkilerinin ortaya çıkmasından dolayı bor bileşiklerine olan ilgi gittikçe artmaktadır. Bor bileşiklerinin kanser hücreleri üzerinde proteozom inhibitörü olarak çalıştığı birçok çalışmada gösterilmiştir (13). Çalışmamızda sağlıklı insan lenfositleri ve HL-60 (lösemi) hücreleri üzerinde borik asit ve sodyum tetra borat (boraks) bileşiklerinin etkilerini ayrı ayrı MTT, Neutral Red, Akış hücremetre ve Geçirimli elektron mikroskopunu kullanarak değerlendirdik. Sitotoksik etkilerini saptamak için 100, 250, 500, 1000 μ M konsantrasyonlarda hücrelerimize borik asit veya sodyum tetra borat verdik ve bunun için MTT yöntemini kullandık. Borik asitte 500 μ M'da % 50, sodyum tetra boratta ise ölü hücre oranının % 40' lara ulaştığını bulduk. Diğer taraftan kontrol olarak kullandığımız sağlıklı insan lenfositlerinde bu oran en yüksek dozda bile % 20' leri geçmemektedir. Lizozomal aktivite açısından etkileri görebilmek için de hücrelerimizi nötral kırmızısı boyasıyla boyadık. Aynı konsantrasyonlarda her iki bileşikte de % 10 kadar lizozomal aktivitede bir azalış saptadık. Sağlıklı insan lenfositlerinde ve lösemi hücrelerinde borik asit ve sodyum tetra boratın apoptotik etkisini akridin oranj ile akış hücremetrede değerlendirdik. Borik asitin 1000 μ M olan konsantrasyonunda sağlıklı lenfositlerde % 2,5, HL-60 hücrelerinde % 8,8 apoptotik etki bulduk, sodyum tetra boratta ise 1000 μ M da sağlıklı lenfositlerde % 3,1, HL-60 hücrelerinde ise % 4,9 apoptotik etki bulduk. Bor bileşiklerinin akut lösemi hücreleri üzerindeki ince yapı değişikliklerini saptayabilmek için transmission (geçirimli) elektron mikroskopunda inceledik. Borik asit 500 μ M konsantrasyonunda hem akut lösemi hücrelerinde hem de lenfositlerde çift nukleus ve mikronukleus oluşturdu. Akut lösemi hücrelerinde mitokondrilerin boyutlarında büyüme, kristalarında deformasyonlar ortaya çıktığını saptadık.

Bizim sonuçlarımıza göre, sağlıklı lenfositlerle akut lösemi hücrelerini kıyasladığımızda bor bileşikleri lösemi hücrelerine daha etkilidir ve bu toksik etkiyi mitokondriler üzerinden göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: HL-60, Borik asit, Sodyum tetra borat, Akridin Oranj, Geçirimli Elektron Mikroskobu

SUMMARY

Recently, as the effects of malignancies have come out, the attention on boron compounds has been taken and is gradually increasing. There are experiments in which boron compounds work as a proteasom inhibitor on cancer cells (13). In our study, we investigated the effects of boric acid and sodium tetra borate on MTT, Neutral Red, Flow cytometry, transmission electron microscope methods on acute leukemia cell lineage and healthy human lymphocyte. We used MTT method to evaluate cytotoxic effect by following the one night incubation of leukemic cells in 100, 250, 500, 1000 μM concentrations with boric acid and sodium tetra borate. We found that in boric acid at 500 μM there were dead cells at the rate of % 50 and in sodium tetra borate at the rate of % 40. On the other hand, in healthy human lymphocytes used as a controller this rate did not reach % 20s even in the highest concentration. In terms of lysosomal activity to see the effects we dyed the cells with the neutral red by following the one night incubation of boric acid and sodium tetra borate in 100, 250, 500, 1000 μM concentrations. We detected a decrease % 10 in both compounds in the same concentrations and in the lysosomal activity. We evaluated the apoptotic effect of boric acid and sodium tetra borate to lymphocyte and leukemic cell line by flow cytometry using acridine orange methods. Apoptotic effect was found boric acid 1000 μM concentration % 2,5 in normal lymphocyte, 1000 μM concentration % 8,8 HL-60 cell lines and sodium tetra borate 1000 μM concentration % 3,1 normal lymphocyte, 1000 μM concentration % 4,9 HL-60 cell lines respectively. We examined the boron compounds by means of transmission electron microscope method to detect their effects on the acute leukemia cells. We observed that boric acid in 500 μM concentration caused the double nucleus and micronucleus formation in both acute leukemia cells and lymphocytes. We determined that an expanding in the dimension of mitochondrium and a deformation in cristas appeared.

According to our results, boron compounds show a toxic effect on the acute leukemia cells with comparing normal lymphocyte and this effect is via with the mitochondrial pathway.

Key Words: HL-60, Boric Acide, Sodium tetra borate, Acridine Orange, Transmission Electron Microscope

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
SUMMARY	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. BOR ELEMENTİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	2
2.1.1. <i>Borik Asit ve Sodyum tetra borat</i>	3
2.1.2. <i>Borun İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi</i>	4
3. LENFOSİTLER.....	6
3.1. B Lenfositler.....	7
3.2.T Lenfositler.....	8
3.2.1. <i>Thelper (CD 4 +) hücreleri</i>	8
3.2.2. <i>T Supressor (CD 8 +) hücreleri</i>	9
4. AKUT LÖSEMİLER.....	9
4.1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)	10
4.2. Akut Myeloid Lösemi (AML).....	10
4.3. HL-60 Hücreleri	11
5. Bor Bileşiklerinin Etkisinin Değerlendirme Testleri.....	11
5.1. Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Testler ve MTT Ölçümü	11
5.2. Lizozomal Aktiviteye Dayanan Testler ve Nötral Kırmızı (NR) Ölçümü.....	12
5.3. Akış Hücremetre ile Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi.....	13
5.4. Transmission (Geçirimli) Elektron Mikroskopu ile Hücre Organellerinin Değerlendirilmesi	13
6. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	14
6.1. SİTOTOKSİSİTE VE APOPTOSİZ YÖNTEMLERİ.....	14

6.1.1. Sağlıklı İnsan Lenfositlerinin ve HL-60 Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması.....	14
6.1.2. MTT Testinde Uygulanan İşlemler	16
6.1.3. Neutral Kırmızısı Lizozomal Aktivite Ölçümü	17
6.1.4. Akridin Oranj ile Flow Sitometride (Akış Hücremetre) Apoptosis Bakılması	17
6.1.5. Geçirimli Elektron Mikroskobu	18
7. İstatistiksel Analizler	19
8. BULGULAR	20
9. TARTIŞMA.....	49
10. SONUÇLAR.....	57
11. ÖNERİLER	60
12. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	61
13. EKLER DİZİNİ	68
14. ÖZGEÇMİŞ.....	69

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Borik Asitin Sağlıklı İnsan Lenfositleri Üzerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (MTT).....	21
Tablo:2 Sodyum tetra boratın Sağlıklı İnsan Lenfositleri Üzerine Olan Etkisininİstatistiksel Sonuçları (MTT)	23
Tablo 3: Borik Asitin HL-60 Hücrelerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (MTT).....	25
Tablo:4 Sodyum tetra boratın HL-60 Hücrelerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (MTT).....	27
Tablo: 5 Borik Asitin Sağlıklı İnsan Lenfositleri Üzerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (Neutral Red).....	29
Tablo 6: Sodyum tetra boratın Sağlıklı İnsan Lenfositleri Üzerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (Neutral Red)	32
Tablo 7: Borik Asitin HL-60 Hücrelerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (Neutral Red).....	33
Tablo : 8 Sodyum tetra boratın HL-60 Hücrelerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (Neutral Red).....	36
Tablo 9: Sağlıklı Lenfositlere ve HL-60 Hücrelerine Borik Asitin Apoptotik Etkisi	42
Tablo 10: Sağlıklı Lenfositlere ve HL-60 Hücrelerine Sodyum tetra boratın Apoptotik Etkisi.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Borik asitin sağlıklı lenfositler üzerine mitokondriyal aktivite açısından sitotoksik etkileri	20
Şekil 2: Sodyum tetra boratın sağlıklı lenfositler üzerine mitokondriyal aktivite açısından sitotoksik etkileri	22
Şekil 3: Borik asitin HL-60 hücreleri üzerine mitokondriyal aktivite açısından sitotoksik etkileri	24
Şekil 4: Sodyum tetra boratın HL-60 hücreleri üzerine mitokondriyal aktivite açısından sitotoksik etkileri	26
Şekil 5: Borik asitin sağlıklı lenfositler üzerine lizozomal aktivite açısından sitotoksik etkileri	29
Şekil 6: Sodyum tetra boratın sağlıklı lenfositler üzerine lizozomal aktivite açısından sitotoksik etkileri	31
Şekil 7: Borik asitin HL-60 hücreleri üzerine lizozomal aktivite açısından sitotoksik etkileri	33
Şekil 8: Sodyum tetra boratın HL-60 hücreleri üzerine lizozomal aktivite açısından sitotoksik etkileri	35
Şekil 9: Borik Asitin sağlıklı lenfositler üzerine olan etkisinin akış sitometride değerlendirilmesi	37
Şekil 10: Sodyum tetra boratın sağlıklı lenfositler üzerine olan etkisinin akış sitometriyle değerlendirilmesi	38
Şekil 11: Borik asitin HL-60 hücrelerine olan etkisinin akış sitometride değerlendirilmesi	39
Şekil 12: Sodyum tetra boratın HL-60 hücreleri üzerine olan etkisinin akış sitometride değerlendirilmesi	41

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Fotoğraf 1: Sağlıklı lenfositlere borik asit uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi. A-Kontrol grubu, B-250 μ M borik asit konsantrasyonu, C-500 μ M borik asit konsantrasyonu, D-1000 μ M borik asit konsantrasyonu 48

Fotoğraf 2: HL-60 hücrelerine borik asit uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi.. A-Kontrol grubu, B-250 μ M borik asit konsantrasyonu, C-500 μ M borik asit konsantrasyonu, D-1000 μ M borik asit konsantrasyonu 49

Fotoğraf 3: Sağlıklı lenfositlere sodyum tetra borat uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi. A-Kontrol grubu, B-250 μ M sodyum tetra borat konsantrasyonu, C-500 μ M sodyum tetra borat konsantrasyonu, D-1000 μ M sodyum tetra borat konsantrasyonu..... 51

Fotoğraf 4: HL-60 hücrelerine sodyum tetra borat uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi.. A-Kontrol grubu, B-250 μ M sodyum tetra borat konsantrasyonu, C-500 μ M sodyum tetra borat konsantrasyonu, D-1000 μ M sodyum tetra borat konsantrasyonu..... 52

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bor ülkemizin geleceği için çok önemli bir elementtir. Dünya bor rezervinin % 70' nin Türkiye' ye ait olması bu madenin ülkemiz için ne kadar hayati bir değere sahip olduğunu gözler önüne sermektedir. Bu nedenle ülkemizdeki bor kaynakları çok farklı yerlerde değerlendirilmeye çalışılmaktadır. Bu alanlardan birisi de sağlık alanıdır. Bor birçok ülkede günlük 1 mg' a kadar vitamin olarak kullanılmaktadır. Sağlık alanında kullanabilecek en uygun yerlerden biri kanser tedavisi olup olmadığının araştırılmasıdır. Bor bileşiklerinin birçok kanser türünde (prostat kanseri, lösemi, beyin kanserleri gibi) in vitro çalışmalarla etkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle beyin kanserlerinin tedavisinde sağlıklı hücrelere zarar vermeden BNCT (Boron Neutron Capture Therapy) yönteminde kullanılmaktadır. Birçok kanser türünde tümörün küçülmesine ve kanserli hücrelerin ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (13). Biz çalışmamızda akut lösemi hücreleri üzerinde borik asit ve sodyum tetra boratın etkisini farklı tekniklerle araştırmayı amaçladık. Kontrol grubu olarak sağlıklı insan kanından izole edilmiş lenfositleri kullandık. Bunun nedeni hem deneylerimize kontrol grubu oluşturmak hem de kanser hücrelerine zarar veren bor bileşiklerinin sağlıklı hücrelere olan etkisini araştırmaktır. Ülkemizde kanser sıralaması bakımından 6. sıraya sahip olan lösemilerin tedavisi açısından bu çalışmanın önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bundan sonra farklı lösemi türlerinde çalışmalara olanak sağlaması ve bu hastaların tedavisi için bir umut ışığı olabileceğinden dolayı bu çalışmanın ülkemiz açısında önemli olduğunu düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bor Elementinin Genel Özellikleri

Bor, yeryüzünde toprak, kaya ve suda yaygın olarak bulunan bir elementtir. Bor, doğada serbest element olarak değil, tuz şeklinde bulunur. Bor tuzlarına, "bor madenleri" ; bor madenlerinin kimyasal olarak işlenmesi sonucunda elde edilen ürünlere ise, "bor ürünleri" denilir. Bor yer kabuğunun % 0,001' ini oluşturan; kütle numarası 10 ve 11 olan iki izotopu bulunan metalle ametal arası yarı iletken özelliklere sahip bir elementtir. Atom numarası 5, atom ağırlığı 10,81, yoğunluğu 2,84 gr/cm³, ergime noktası 2300 °C ve kaynama noktası 2550 ° C olan, su ile 100 ° C, oksijenle 700 °C, hidrojenle 840 °C reaksiyona girebilen bir maddedir. Yüksek sıcaklıkta su ile reaksiyonu sonucunda borik asit ve diğer bor bileşiklerine dönüşür. Tabiatta yaklaşık 230 çeşit bor minareli bulunmaktadır (48).

Toprağın bor içeriği genelde ortalama 10–20 ppm olmakla birlikte ABD' nin batı bölgeleri ve Akdeniz' den Kazakistan' a kadar uzanan yörelerde yüksek oranlarda bulunur. Deniz suyunda 0,5–9,6 ppm, tatlı sularda ise 0,01–1,5 ppm aralığındadır. Yüksek orandaki ve ekonomik boyutlardaki bor yatakları, borun oksijen ile bağlanmış bileşikleri olarak daha çok Türkiye ve ABD' nin kurak, volkanik ve hidrotermal aktivitesinin yüksek olduğu bölgelerde bulunmaktadır (48).

Tarihte ilk olarak 4000 yıl önce Babil' ler Uzak Doğu'dan boraks ithal etmiş ve bunu altın işletmeciliğinde kullanmışlardır. Mısır' ılıların da boru, mumyalamada, tıpta ve metalürji uygulamalarında kullandıkları bilinmektedir. Eski Yunanlılar ve Roma' ılılar boru, temizlik maddesi olarak kullanmışlardır (48).

Elementel bor, 1808 yılında Fransız Kimyacı Gay Lussac ile Baron Louis Thenard ve bağımsız olarak İngiliz Kimyacı Sir Humphry Davy tarafından bulunmuştur.

Dünya bor rezervinin % 70' i Türkiye'de bulunmaktadır. Sırasıyla ABD, Arjantin, Peru, Rusya ve Çin izlemektedir. Fakat üretim açısından ülkemiz bor üreten altı ülke arasında ikinci sırada yer almaktadır. Dünyada işlenen toplam 496 milyon tonluk rezervin 375 milyon tonu Türkiye' dedir. Türkiye'nin bor madenlerinin rezerv ömrü 412 yıl iken, dünyanın ikinci büyük rezerv ülkesi olan ABD' nin bor rezervleri yaklaşık 76 yıllık ömre sahiptir (48).

2.1.1. Borik asit ve sodyum tetra borat

Borik asit; H_3BO_3 formülünde, molekül ağırlığı 61,83 özgül ağırlığı 1,435 gr/dl olan bir maddedir. Deneylerimizde kullandığımız sodyum tetra borat ise; bir rafine boraks türü olup, $Na_2B_4O_7$ formülünde 381,37 molekül ağırlığı olan bir maddedir. Çözeltilerinin kristalizasyonu ile doğal kalsiyum boratların veya borik asitin sodyum karbonatla muamele edilmesi suretiyle elde edilir. Anhidrus veya hidrate (5–10 mol H_2O) halde olur. Isıtılıp tekrar soğutulduğunda camsı bir kütle ortaya çıkar (eritilmiş boraks, boraks camı, boraks incisi (boncuğu) gibi isimler alır). Keten veya kâğıdın sertleştirilmesinde; metallerin lehimlenmesinde (sert lehimler için eritici madde olarak); eritici madde olarak emaye sanayinde; cam haline gelebilen boyaların, özel camların (optik camlar, elektrik ampulleri için camlar) imalinde, zambak veya cilaların imalinde; altının rafine edilmesinde; boratların ve antrakinon boyaların hazırlanmasında kullanılır (39).

Bor ürünleri, boraks (dekahidrat, pentahidrat, susuz boraks), borik asit ve sodyum perborattan (monohidrat, tetrahidrat) oluşur. Bor ürünleri, Uluslararası Sanayi Standart Sınıflandırması'na göre Kimya Sanayi içinde yer alır. Her üç bor ürününün üretiminde hammadde olarak tıncal kullanılabilir. Ancak Türkiye ve Avrupa' da borik asit üretiminde kolemanit ve uleksit kullanılmaktadır. Sodyum perborat ise hem tıncalden hem de borakstan üretilir. Boraks, borik asit ve sodyum perborattan oluşan bor ürünleri, doğrudan doğruya başka maddelerin üretiminde veya diğer sanayi dallarında hammadde olarak kullanılıyor (39).

2.1.2. Borun insan sağlığı üzerine etkisi

Vücuda hangi yolla alınıralsa alınsın % 90-95' i vücutta birikmeden idrarla dışarı atılmaktadır. Yalnızca kemik, tırnak, kıl, karaciğer ve dalakta biraz birikmektedir. Yapılan araştırmalar borun toksik etkisinin çok düşük olduğunu göstermektedir. Borun akut etkisi, 15–30 gr sodyum tetra borat veya 2–5 gr borik asit doğrudan alınıralsa ortaya çıkmaktadır. Kronik etkisi açısından günde 3 g borik asit veya 5 g sodyum tetra boratın etkisinin olmadığı, 5–10 g boraksın sadece protein metabolizmasını etkilediği ve idrardaki azot miktarını arttırdığı gözlemlenmiştir (41).

Borun toksik etkisi yetişkinlerde baş ağrısı, kusma, ishal, heyecan veya depresyon; çocuklarda ise daha çok havale, koma gibi beyin zarı tahribi etkileri şeklinde görölmektedir. Parmak uçlarında görölen pembe renk bor ile zehirlenmeye işaret eden karakteristik görünüşlerdir.

Borun insan vücutu için çok yararlı etkileri olduğu da tespit edilmiştir. D vitamini ve kalsiyum olmak üzere vücut minerallerinin düzenlenmesinde rol oynadığı, kalsiyum ve magnezyum azalmasını önleyerek kemik yapısını koruduğu belirtilmiştir. Klinik çalışmalar, Ca ve Mg eksikliğinden kaynaklanan stresi önlemek için günde en az 1 mg borun yararlı olduğu ortaya konmuştur (WHO 1998). Bor mineralinin Ca ve D vitaminin aktivasyonun yanında, kemik dokusunun korunması ve demineralizasyonun önlenmesinde, bağışıklık ve hormonal sistemin güçlendirilmesinde etkili olduğu belirtilmektedir. Bu iki elementin eksikliğinden kaynaklanan osteoporoz riskini önlediği, vitamin D ve steroid hormonunun aktif şekline dönüşmesine yardımcı olduğu, artriti önlediği saptanmıştır. Bir bor türevi olan sodyum tetraborat dekahidrat günümüzde artrit tedavisinde kullanılmaktadır (33).

BNCT (Boron Neutron Capture Therapy) kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle, beyin kanserlerinin tedavisinde hasta hücrelerinin sečilerek imha edilmesinde kullanılmaktadır. Sağlıklı hücrelere zararının minimum düzeyde olması nedeniyle tercih nedeni olabilmektedir (47).

Bor bileşikleriyle yapılan çalışmalarda çok farklı hücreler kullanılmıştır. Bunlar prostat kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri ve lösemi hücreleridir. Ayrıca borun günlük düzenli alınımıyla sağladığı yararlarla ilgili de birçok çalışma yapılmıştır (47).

2002 yılında Gallardo-Williams tarafından yapılan bir araştırmada günde 1,7 yada 9,0 mg/kg borik asit alınımı tümör boyutunu % 38 oranında azalttığı gözlenmiştir. Yine bu çalışmada prostat kanserinde yükselen prostat spesifik antijeni de % 86 oranında azalttığı görülmüştür. Özellikle tümör hücrelerinde mitoz miktarında azalma görülmüştür. Mitoz miktarı azalınca tümör büyüklüğünde de gerileme olduğu görülmüştür (43).

2001 yılında Florida'da Deneysel Biyoloji Konferansında açıklanan, 7651 kanser olmayan erkek ve 76 prostat kanserli erkek üzerinde yapılan çalışma çok ilginç sonuçları ortaya koydu. Ne kadar çok içinde bor bulunan besin tüketilirse (sert kabuklu meyveler, kuru meyveler, baklagiller, üzüm, elma, brokoli, avokado, kiraz, kuru erik, soya fasulyesi) prostat kanseri olma riskinin o kadar azaldığı, maksimum düzeyde bor tüketen insanlar da prostat kanserinde % 64 oranında azalma olduğu görüldü (43).

2000 yılında Texas'da yapılan etken madde olarak Borato 1–2 diaminosikloheksan platinum kullanılan çalışmada; L210 (leukemia murine cell), MCF–7 (human breast cell), DU–145 (human prostate cell), A–549 (human lung cell), SK-OV–3 (human ovarian cell) hücre serileri kullanılmıştır. Sonuçta % 50–98 oranında DNA sentezinin inhibe edildiği görülmüştür. Böylelikle DNA sentezi inhibe olan kanser hücreleri daha fazla çoğalamamıştır (13).

Bir çalışmada bor tozlarıyla temas eden işçilerin sperm sayısında düşüklük, cinsel hayatlarında gerileme olduğu iddia edilmiştir. Ancak ülkemizde ve dünyada yapılan pek çok araştırmada borun kısırlığa yol açmadığı sonucuna varılmıştır (49).

Son yıllarda bir kemik iliği kanseri olan multipl myelomun tedavisinde kullanılan bortezomib (borik asit polimerlerinden oluşan bir ilaç), hastalığın tedavisinde ve

ilerlemesinde yeni umutlar ortaya çıkarmıştır .Bu ilaç çeşitli kombinasyonlarda kemoterapi tedavisinde kullanılmaktadır. Bortezomib bu hücreler üzerinde proteozom inhibitörü olarak çalışmış, ilk 48 saat içinde hücreleri apoptosize götürerek öldürmüştür. Bor' un benzer proteozomlar üzerine etkisi olduğuna göre hematolojik malignansilerin tedavisinde etkili olabileceği düşünülmektedir (33).

Bor bileşikleri, apoptoz mekanizması bozulmuş kontrolsüz olarak çoğalan kanser hücrelerini apoptozise götürerek kanser hücrelerinin ölümüne yol açarlar ve varsa tümörün büyümesini inhibe ederler. Yapılan çalışmalarda bugüne kadar varılmaya çalışılan sonuçlar şunu göstermiştir ki; bor bileşikleri proteozom inhibitörü olarak çalışırlar (16).

Proteozomlar tüm canlılarda bulunan ATP'ye bağımlı proteolitik sistemi oluşturan büyük bir komplekstir (26). Proteozomların fonksiyonları normal hücrelerde apoptoza karar vermiş hücrelerin proteinlerini parçalamak, kanserli hücrelerde de apoptoza gidemeyen hücrelerin proteinlerini parçalamaktır. Proteozom inhibitörleri, proteozomların fonksiyonlarını inhibe eder, protein yapımını güçleştirir ve çoklu sinyal iletimini engellerler. Sinyal iletimi kesilince kanserli hücreler ölür ve tümörün büyümesi baskılanır (33).

3. LENFOSİTLER

9–12 µm çapında, spesifik immuniteden sorumlu hücrelerdir. Büyük ve yuvarlak bir nukleusa, dar bir stoplazmaya ve azurofilik (lizozomal) granüllere sahip hücrelerdir. Ribozomların bol oluşu nedeniyle stoplazma güçlü bir bazofili gösterir. İnsan vücudunda total 10^{12} kadar lenfosit bulunduğu ve hergün yaklaşık 2 milyon yeni T hücrelerinin ve 20 milyon B hücrelerinin yapıldığı hesaplanmıştır (Scollay ve Osmond). Vücuttaki total lenfosit sayısının % 2 kadarını periferik kan lenfositleri oluşturur. Lenfositlerin büyük çoğunluğu lenfoid organlarda bulunur. Periferik kanda lökositlerin % 20–30 kadarını lenfositler oluşturur (42).

Genel olarak, viral hastalıklarda, bazı bakteriyel hastalıklarda, enfeksiyon hastalıklarının nekahat döneminde ve nötropeni ile gidiş gösteren durumlarda mutlak sayıları veya lökositler içindeki dağılım oranları artar. Lenfositler T lenfositler ve B lenfositler olmak üzere ikiye ayrılırlar (42).

3.1. B Lenfositler

Memelilerde B hücreleri fetal dönemde karaciğerde ve erişkinlerde kemik iliğinde üretilirler. Bu hücreler, embriyoda paraaortik splankno-plevra bölgesinde yer alan ortak bir multipotent prokürsör olan hematopoetik kök hücrelerden gelişirler (42).

B hücrelerinin gelişimi, kemik iliğinde pro-B hücreleri ile başlar ve plazma hücreleri ve bellek hücrelerinin oluşmasıyla sona erer. B hücrelerinin gelişim aşamalarını tamamlayabilmeleri self-tolerans için gerekli kontrol noktalarında başarıyla geçmelerine bağlıdır. Bu kontrol noktaları, B hücre reseptörünün (BCR) aracılık ettiği ve hücrelerin yaşam ve ölümlerini belirleyen ve IgV (D) J gen rekombinaz sistemlerini regüle eden pozitif negatif sinyallerin katıldığı bir fonksiyonel mekanizmadır. Bu kontrollerden geçen hücrelerin daha azı da antijenle yönlendirilen germinal merkez reaksiyonuna (GCR) katılabilirler ve çoğalabilirler (51).

B hücrelerinin olgunlaşması, pozitif sinyal almalarını gerektirir. Ancak bu sinyallerin antijen-spesifik olmasına gerek bulunmadığı düşünülüyor. BCR bazal sinyali (B hücrelerinin kendilerinden salınan anti-apoptotik sinyal) B hücre gelişiminin desteği için yeterlidir ve antijenik ligand' dan alınan bir sinyal olmaksızın B hücresi perifere göç eder (51).

Olgunlaşmamış B hücreleri apoptozla ortadan kaldırılırlar. Böyle hücreler apoptoza ve tolerans mekanizmasına daha duyarlıdır. Apoptozu baskılayıcı protein Bcl-2' nin aşırı ekspresyonu, in vivo otoantijen varlığında çok sayıda B hücresini “reseptör editing”

yapmaya mecbur bırakır. Geçici evredeki B hücreleri Ig M, Fas, Bcl-2, Ig D karakter taşırlar ve apoptozu etkileyen antijen temasına çok duyarlıdırlar. Ig M ile birlikte Ig D eksprese eden olgun hücreler ise düzenleme yapma yeteneklerini kaybederler ve dolayısıyla self-antijen temasında apoptoza uğrarlar. BCR ile güçlü bir sinyal iletimi, kemik iliğinde olgunlaşmamış B hücrelerinin düzenleme yeteneğini ve geçici ara evre hücrelerinde klonal eliminasyonu indükler (34).

3.2. T Lenfositler

Intrauterin yaşam sırasında, pro-timosit fenotipi, fetal karaciğer ve vitellüs kesesinde, gebeliğin 7. haftasından itibaren görülmeye başlar. 8–9 haftadan itibaren fetal timus gelişmeye başlar. Gebeliğin 14. haftasından itibaren majör timositler oluşmaya başlar. Daha sonra T hücrelerinin sayısı kanda artmaya başlar. Bu artış altı aya kadar devam eder daha sonra yetişkindeki düzeye iner (42).

3.2.1. *Thelper (CD 4 +) hücreleri*

Kandaki lenfositlerin % 35–60 kadarını oluştururlar. Akut ve kronik inflamasyonu ve geç tipte hücresel aşırı duyarlılığı inhibe ederler. Alerjik olaylarda selektif inhibisyon yaparlar. Antikor yapımına aktif olarak katılırlar ve eozinofiliyi indüklerler. Özellikle opsonizan antikor yapımına yardımcı olmakla beraber, asıl sitolitik aktivite gösterirler. Th1 subpopulasyonundaki hücrelerin % 77' si sitolitik aktiviteye sahip iken; Th2 subpopulasyonundaki hücrelerin sadece % 18 kadarı sitolitik aktivite gösterir. T helper 1 ve T helper 2' nin sitokin profilide farklıdır. (Th1) Thelper-1; Interferon-gama, TNF-beta, IL-2, IL-3 varken Th2'de IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 bulunur (42).

Helper T lenfositleri, MHC klas II molekülleri ile sunulan peptitleri tanırlar ve antikor yapıcı B hücrelerinin, sitotoksik T hücreleri ve supresor T hücrelerinin

aktivitelerini şiddetlendirir. Th hücrelerinin azlığında efektör T ve hücrelerinin antijene cevabı zayıf olur. Bu hücreler ayrıca çeşitli lenfokinler salgılayarak, T hücrelerinin, monosit ve makrofajların ve diğer bazı hücrelerin sayıca ve etkinlikçe güçlenmelerini sağlarlar. Normalde CD 4 + lenfositleri genellikle sitotoksiste göstermezler. Ancak bazı patolojik durumlarda (otoimmün hastalıklar) bu hücrelerin belirgin sitotoksiste gösterebileceklerini bildirmiştir (42).

3.2.2. T Supressor (CD 8+) hücreleri

CD 8+ hücreleri yüzey işareti taşıyan subpopulasyonda geç duyarlık reaksiyonlarını ve antikor yapımını inhibe eden T supresor hücreleri ile sitotoksik fonksiyon yapan efektör T hücreleri bulunur. Bu hücreler genel olarak MHC Klas -1 molekülleri ile sunulan peptitleri tanırlar. Bazı CD 8+ hücrelerinin IL-1, IL-10 ve TGF-beta gibi potent immunregulator sitokin salgıladıkları bilinir. Regülator/supressor CD 8+ hücreleri farklı olarak MHC klas-2 molekülleri ile sunulan antijeni tanıyabilirler. CD 8+ hücreleri esas itibarıyla Th 1 hücrelerinin sitokin yapısına sahiptirler. Ancak IL-2 sentez kapasiteleri oldukça düşüktür (42).

4. AKUT LÖSEMİLER

Akut lösemiler myeloid ve lenfoid öncü hücrelerinin neoplastik transformasyonu sonucu oluşurlar. Löseminin diğer tümörler ile karşılaştırıldığında önemi, kanser mortalite oranlarına bakıldığında görülebilir. Lösemi kanserden ölüm nedenleri içerisinde erkeklerde akciğer, prostat, kalın barsak, pankreas ve mideden sonra 6. sırada; kadınlarda ise meme, akciğer, kalın barsak, over ve pankreastan sonra yine 6. sırada yer almaktadır. Görülme sıklığına bakıldığında son 50 yılda önemli bir artış vardır. AML erkeklerde 1:100 000'den 3:100 000'e bir artış saptanmıştır. AML' nin sıklığı yaşla çok ilgilidir. On yaş civarı en az görüldüğü dönemdir ve 40. yaşa kadar giderek yavaş bir artış vardır. ALL' de ise durum

tam tersidir. ALL en çok çocuklarda görülür. 30. yaşta minimuma iner, daha sonra 40. yaşta tekrar hızla artar (51).

4.1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

ALL' de görülen lenfoblastlar dar, stoplazmaları agranülerdir. Nukleo stoplazmik oran yüksek olup, çekirdek yuvarlak veya kıvrıktır. Lenfoblastlar genel olarak myeloblastlardan daha küçüktür. Kendi arasında 5 alt gruba ayrılır:

- A1) Pro B ALL,
- A2) Common ALL,
- A3) Pre B ALL,
- A4) B ALL
- A5) T ALL

4.2. Akut Myeloid Lösemi (AML)

Myeloblastlar, lenfoblastlardan daha büyüktür. Myeloblastların stoplazmaları daha geniş olup nukleo-stoplazmik oran düşüktür. Çekirdekte kromatin ağı ince olup, multipl nukleoluslar vardır. FAB sınıflandırmasına göre 8 alt gruba ayrılır:

- B1) M0: Hiç maturasyon göstermeyen AML
- B2) M1: Maturasyon göstermeyen AML
- B3) M2: Maturasyon gösteren AML
- B4) M3: Promyelositik lösemi
- B5) M4: Akut myelomonositik lösemi
- B6) M5: Akut monositik lösemi

B7) M6: Akut eritrolösemi

B8) M7: Akut megakaryositik lösemi

4.3. HL-60 Hücreleri

HL-60 hücreleri, akut promyelositik lösemi hücre serisidir. Özellikle ilaç araştırmalarında kullanılan bir hücre serisidir. Bor bileşiklerinin lösemi hücreleri üzerine olan etkisi daha önceki birçok araştırmada ortaya konmuştur. 2001–2002 yıllarında Hindistan’ da yapılan **lösemi hastaları** ve **lösemi hücre serileri** üzerinde ve yeni bulunan guanidin biborik asit ve dihidroksi bor hidroklorid monohidrat kullanılan çalışmada bu bileşiklerin tümör hücrelerinin büyümesini engellediği, DNA üzerinde inhibisyon sağladığı gözlemlenmiştir. Bor bileşiklerinin uygulanmasından 24 saat sonra hücrelerde apoptotik cisimciklerin oluşmaya başladığı, hücre çekirdeğinin nükleer yapısının bozulmaya başladığı, kromatin yapının yoğunlaştığı, stoplazmik vakuollerin oluştuğu gözlemlenmiştir (32, 15).

5. BOR BİLEŞİKLERİNİN ETKİSİNİ DEĞERLENDİRME TESTLERİ

5.1. Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Testler ve MTT Ölçümü

İn vitro çalışmalarda hücre sayısının ifade edilmesini sağlayan farklı biyolojik ölçümler vardır. MTT hücre proliferasyon ölçümü, hücre proliferasyonunu, canlılığını ve sitotoksisiteyi ölçmekte kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir (38). Bu tekniğin mitokondriyal enzim sistemleri tarafından katalize edilen tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayandığı ve hücre büyümesi ve ksenobiyotik sitotoksisitesini yansıttığı bildirilmiştir. Her ne kadar kolay, uygulanabilir ve kolaylıkla otomatize edilebilir olsa da belirli artefaktlar tarafından etkilenmektedir.

Yaşayan hücreler bazı vital boyalar kullanılarak boyanabilmektedir, ancak yıkama basamakları hem süreyi uzatmakta, hem de hata payını arttırmaktadır. ELIZA cihazı çok

miktarda örneği, yüksek oranda doğrulukla okuyabilir, böylece kullanılan renk reaksiyonunu yaşayan hücre sayısı olarak değerlendirilme imkanı sağlar. Bu tür kolorimetrik ölçümlerde ideal olan renksiz substratlar kullanarak yaşayan hücrelerde renkli ürünler elde etmektir. Tetrazolyum tuzları bu amaçla kullanılan, substrat olarak renksiz, yaşayan hücrelerin aktif mitokondrilerinde renkli ürünler veren maddelerdir. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) bu amaçla kullanılan bir tetrazolyum tuzudur ve substrat olarak sarı renkte olmasına rağmen yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzları oluşturur. Formazan tuzları organik solventlerde (DMSO, izopropanol gibi) kolayca çözünürler. Çözücüde çözünen materyalin optik dansitesi, çözülmüş olan boyanın konsantrasyonunun verdiği absorbansa göre spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Ölçülen değer direkt olarak kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini verir, bu değer de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir (45).

5.2. Lizozomal Aktiviteye Dayanan Testler ve Nötral Kırmızısı (Neutral Red) Ölçümü

Nötral kırmızısı (NR) (neutral red, toluylene red, Basic Red 5, ya da C.I. 50040) gibi isimlerle bilinen Borenfreund ve Puerner (2000) tarafından tanımlanan ve çok yaygın olarak kullanılan bu vital teknik, lizozomlar tarafından katyonik boya'nın hücre içine alınmasına dayanır. Supravital bir boya olan neutral red up-take (nötral kırmızısının hücre içine alınması) zayıf katyonik bir boyadır ve noniyonik difüzyonla hücre membranından penetre olarak lizozomlarda akümüle olur ve lizozomal matriksin anyonik bölgelerine bağlanır. Hücre yüzeyinde veya lizozomal membranda meydana gelen değişiklikler lizozomal hassaslığa ve diğer irreversibl değişimlere önderlik ederler. Ksenobiyotiklerin aktivasyonu ile meydana gelen bu değişimler NR' in bağlanmasında veya hücre içine alınmasında azalmaya sebep olur. Bu nedenle yaşayan- sağlıklı, hasarlı-ölü hücrelerin boyayı almaları farklı olur ki, bu da yöntemin temelini oluşturmaktadır. Uygulanabilirliği yüksek ve duyarlı olan bu test otomatik hale getirilebilir ve diğer sitotoksikite testleri ile kombine edilebilir. Hücrelerin metabolik aktivitesi farklı düzeylerde tespit edilebilir (38).

5.3. Akış Hücremetre (Sitometri) ile Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi

Akış hücremetre akışkan kısım, optik kısım ve elektronik kısımdan oluşan bir cihazdır. Floresan boyalarla işaretlenmiş olan hücreler sıvı içerisinde cihaz içerisine alınır, çeşitli optik filtrelerden ve lazer sistemlerinden geçtikten sonra hücreler tek tek özelliklerine göre ayrılır. Hücreleri tek tek sayabilmemizden dolayı kolay uygulanabilir olması, uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç vermesi ve bir seferde yüzbinlerce hücre sayılabilesinden dolayı güvenilir bir yöntemdir. Akış hücremetrede apoptotik ve nekrotik hücrelerin ayrılabilmesi için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler içerisinde akrinin oranj boyası DNA miktarını değerlendirebilmemizi sağlayan etkili bir boyadır (2,48).

5.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu ile Hücre Organellerinin Değerlendirilmesi

Yüksek voltaj altında hızlandırılmış elektronların bir numune üzerine gönderilmesiyle, elektronlar ile numune atomları arasında çeşitli etkileşimler olur ve numuneden değişik enerjide elektronlar ve x-ışınları çıkar. Bu etkileşimlerden yararlanılarak numunenin incelenmesi elektron mikroskobunun prensibini oluşturur. Eğer hızlandırılmış elektronlar ince numune üzerine gönderilmiş ise, elektronların bir kısmı etkileşmeden diğer kısmında kırınıma uğrayarak numunenin alt yüzünden dışarı çıkar. Bu tür elektronları kullanarak numunenin iç yapısının incelenmesi geçirimli elektron mikroskobunda yapılır. Transmission Electron Microscope veya kısaca TEM olarak bilinir. Elektron mikroskobu ile hücre içi organellerin yapılarını, hücre içindeki dağılımını ve diğer organellerle komşuluğunu, fonksiyonel ilişkilerini, çekirdeğin yapısını membran bütünlüğünü ya da membrandaki değişiklikleri görmek mümkündür (6).

Bu çalışmada sağlıklı insan lenfositleri ve HL-60 (akut lösemi) hücrelerine borik asit ve sodyum tetra borat 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M, 1000 μ M konsantrasyonlarda uygulandı. Sitotoksik etkileri saptayabilmek için MTT, Neutral Red testleri, apoptotik etliler için Akış hücremetrede akrinin oranj boyası, ince yapı değişikliklerini görebilmek için de geçirimli elektron mikroskobu kullanıldı

6. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hematoloji Anabilim Dalı ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tarafından ortak olarak yürütülmüştür. Çalışmanın hücre kültürü ve elektron mikroskobu olan kısımları Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezinde; Akış Hücremetre kısmı ise Osmangazi Üniversitesi Hematoloji Anabilim Dalı Akış Hücremetre laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmamızda sağlıklı insan lenfositleri ve HL-60 lösemi hücrelerinde borik asit veya sodyum tetra boratın sitotoksik etkilerine, akış hücremetre ile apoptotik etkilerine ve geçirimli elektron mikroskobuyla ince yapı değişiklikleri araştırılmıştır.

6.1. Sitotoksisite Ve Apoptozis Yöntemleri

- 1) MTT (Mitokondriyal Aktivite Testi)
- 2) Nötral Kırmızısı (Lizozomal Aktivite Testi)
- 3) Akridin oranj ile Akış Hücremetresinde apoptozis saptanması
- 4) Transmisyon (geçirimli) elektron mikroskobunda apoptozise uğramış hücrelerdeki ince yapı değişikliklerinin görüntülenmesi

6.1.1. *Sağlıklı İnsan Lenfositlerinin ve HL-60 Lösemi Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması*

a) 50 ml enjektöre 1 ml heparin çekildi içi tamamen heparinle sıvandı. Sağlıklı insandan 50 ml kan alındı. 1:1 oranında fosfat tampon saline (PBS) ile seyreltildi. 50 ml' lik steril tüplerin içine 10⁶ ar ml lenfosit ayırmak için kullanılan ficoll (histopaque 1077) konuldu. Ficoll' un üzerine seyreltilmiş olan kan yavaşça, karıştırılmadan ilave edildi. 700 G' de 30 dk santrifüj edilerek tüpün orta kısmında tabaka olarak ayrılmış olan lenfositler toplandı. 2

K		BA1	BA2	BA3	BA4	K		BX1	BX2	BX3	BX4	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Yukarıda açıklanan şekliyle rezervuarın her kuyucuğuna hesaplanan ölçülerde maddeleri ve mediumu koyduk. 12 kanallı pipetle her kuyucuğa eşit şekilde dağıtıldı.

1. sütun KONTROL
2. sütun Boş bırakıldı. (Kontrol grubunun test maddelerinden etkilenmemesi için)
3. sütun BA1 (Borik asit)
4. sütun BA2
5. sütun BA3
6. sütun BA4
7. sütun KONTROL
8. sütun Boş bırakıldı. (Kontrol grubunun test maddelerinden etkilenmemesi için)
9. sütun BX1 (Sodyum tetra borat)
10. sütun BX2
11. sütun BX3
12. sütun BX4

6.1.2. MTT testinde uygulanan işlemler

MTT 5 mg/ml olacak şekilde PBS içinde çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyon $-20^{\circ}C$ ' de 6 ay bekleyebilmektedir. Çalışma solüsyonu stok solüsyondan 1 kısım ve 9 kısım medium alınarak taze hazırlandı (0,5 mg/ml MTT). Lenfositler ve HL-60 hücrelerine borik asit ve sodyum tetra borat önceden belirlenen konsantrasyonlarda uygulandı. 24 saat inkübatörde bekletildi. Her bir kuyucuğa 0,01 ml MTT çalışma solüsyonu ilave edilerek karbondioksit inkübatöründe 3-4 saat inkübasyona bırakıldı. Bu

süre sonunda plakalar alındı ve hücrelerimizi dökemediğimiz için üzerine 1N HCl ile hazırlanmış 2-propanol 100' er µL ilave edildi ve plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELIZA cihazında 540 nm dalga boyunda okutuldu. Bu deneyin her aşaması boya ışıkta bozulduğu için karanlıkta yapıldı (45,50).

6.1.3. *Neutral Red (Kırmızısı) lizozomal aktivite ölçümü*

Belli konsantrasyonlarda borik asit ve sodyum tetra borat uyguladığımız lenfositler ve HL-60 hücreleri 24 saat inkübatörde bekletildi. Neutral kırmızısının % 0,4'lük stok solüsyonu 1:100 oranında medium ile karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı ve her bir kuyucuğa 0,01 ml ilave edilerek 37 ° C' de 3-4 saat inkübe edildi. Hücrelerimiz süspansiyon hücreler olduğu için yıkama solüsyonu uygulanmamıştır. Okuma solüsyonu olan asetik asit-etanol solüsyonu her bir kuyucuğa 0,1 ml ilave edilerek 15 dk oda ısısında bekletilmiş ve 30 dk çalkalayıcıda çalkalanarak boya homojen hale getirilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELIZA cihazında 540 nm dalga boyunda okutuldu. Bu deneyin her aşaması boya ışıkta bozulduğu için karanlıkta yapıldı (38).

6.1.4. *Akridin oranj ile flow sitometride (akış hücremetre) apoptozis bakılması*

25 cm²' lik flaslara 300 bin olarak olarak ayarlanan hücreler 4 ml medium içinde borik asit ve sodyum tetra boratın 100 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM konsantrasyonlarında uygulandı. 24 saat karbondioksitli inkübatörde bekletildi. Her bir flastan 200 µL hücre alınıp üzerine 200 mikrolitre solusyon A' dan konuldu ve buzda kırkbeş sn bekletildi. Sonra 400 µL solusyon B eklendi. 3-15 dk arasında akış hücremetre cihazında belirlenen dalga boyunda 10 000 hücre olacak şekilde sayıldı. DNA 'daki G1-S-G2 fazları sonuçlar analiz programında değerlendirilerek apoptotik hücre miktarı belirlendi.

Solusyon A ' nın Hazırlanması:

10 ml 2N HCl
4,4 g NaCl
0,5 ml Triton-X-100
480 ml bidistile su

Solusyon B ' nin Hazırlanması:

7,77 g sitrik asit
17,89 g sodyum fosfat
0,37 g EDTA
8,7 g NaCl
1 lt bidistile su
0,6 ml akridin oranj stok solusyonu (Akridin oranj stok solusyon: 1mg/ml)

6.1.5. Geçirimli elektron mikroskobu

Sağlıklı lenfositler ve HL-60 hücreleri steril 50 ml' lik tüplere alındı. 1200 rpm' de 10 dk santrifuj edildi. Önce 10 ml mediumla resüspanse edildi. Daha sonra 50 ml mediuma tamamlandı. 6 kuyucuklu Eliza Petri kutusunun her kuyucuğuna 2 ml medium konuldu. İlk kuyucuk kontrol olduğu için madde konulmadı. Sonraki beş kuyucuğa sırasıyla 100 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM konsantrasyonlarda borik asit ve sodyum tetra borat ilave edildi. 24 saat inkübatörde bekletildi. 24 saatin sonunda her kuyucuğun içindeki medium steril bir tüpe alındı ve 1200 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Üzerindeki medium döküldü. Mediumu uzaklaştırmak için 2 kez fosfat tamponla yıkandı. % 2 ' lik glutaraldehit ile tespit edildi. Tespit işlemi hücrelerin canlılık haliyle korunması için yapıldı. 1 gün tespitte bekletilen hücreler, tespit solusyonundan çıkartıldıktan sonra fosfat tamponla 15' er dakikalık sürelerle 2 kez santrifüj edilerek yıkandı. İlk tespiti yapılan hücreler ikinci

boyama ve tespit için % 1' lik osmiyum tetraoksit solusyonuna alındı. 2 saat bekletildi. 3 kez fosfat tamponla yıkandıktan sonra alkol serilerinden geçirilmeye başlandı. % 50' lik alkolden başlanıp 15' er dakikalık sürelerle % 100' lük alkole kadar hücreler dehidrate edildi. Propilen oksit ve araldit karışımıyla 1 gece rotatorda çevrildi. Saf araldit çözeltisine gömüldü ve 60 °C' de 2 gün etüvde bekletildi. Etüvden çıkartılan bloklar kesit alınabilmesi için trim (traşlama) cihazıyla tıraşlandı .Elektron mikroskobunda incelenmek için ultra mikrotom ile 80–100 nm' lik ince kesitler bakır gridlerin üzerine alındı. Gridler, kurşun sitrat ve uranil asetat boyaarı ile kontrastlık sağlanabilmesi için boyandı. Geçirimli elektron mikroskobunda sağlıklı lenfositlerin ve HL–60 hücrelerinin organellerinden hücre zarı, çekirdek, mitokondri, golgi aygıtı, endoplazmik retikulum ve lizozomları farklı büyütmelede görüntülendi. Bor bileşiklerinin HL–60 hücrelerine ve kontrol olarak kullanılan sağlıklı insan lenfositlerinde yaptığı ince yapı değişikleri geçirimli elektron mikroskobunda incelendi (6).

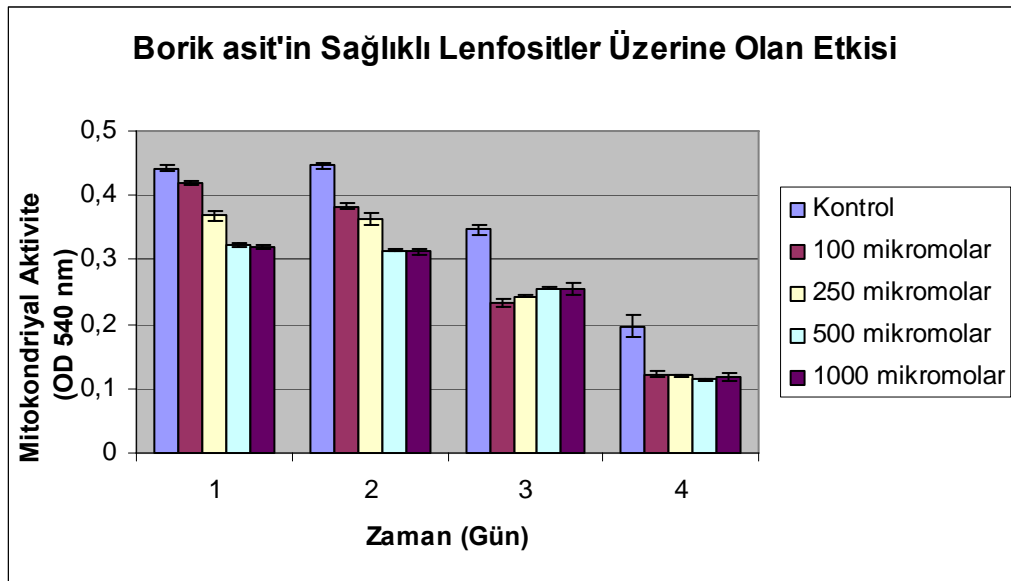
7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel analizler Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında yapıldı. Testler 8 kez tekrar edildi, optik dansite olarak elde edilen değerler SPSS (Statistic Program for Social and Science) yazılım programında, tek yönlü ANOVA testi ve *post-hoc* olarak da Tukey's-b testi uygulandı. Anlamlılık değerleri $p \geq 0,05$ fark yok, $p \leq 0,05$ * önemli derecede fark var, $p \leq 0,01$ ** çok önemli derecede fark var, $p \leq 0,001$ *** ileri derecede fark var olarak değerlendirildi.

8. BULGULAR

Çalışmamızda sağlıklı insan lenfositleri ve HL-60 (lösemi) hücreleri üzerinde borik asit veya sodyum tetra borat (boraks) bileşiklerinin etkilerini MTT, Neutral Red, Akış hücremetre ve Geçirimli elektron mikroskopunu kullanarak değerlendirdik.

Borik Asit'i sağlıklı insan lenfositleri üzerine uygulayıp MTT yöntemi ile değerlendirdiğimizde hücrelerin absorbans değerlerini şöyle bulduk; 1.gün kontrol grubunu değeri 0,44, 100 µM olan konsantrasyonda 0,41, 250 µM olan konsantrasyonda 0,36, 500 µM olan konsantrasyonda 0,32, 1000 µM olan konsantrasyonda 0,31' dir. 2.günde kontrol grubunu değeri 0,44, 100 µM olan konsantrasyonda 0,38, 250 µM olan konsantrasyonda 0,36, 500 µM olan konsantrasyonda 0,31, 1000 µM olan konsantrasyonda 0,31' dir. 3.günde kontrol grubunu değeri 0,34, 100 µM olan konsantrasyonda 0,23, 250 µM olan konsantrasyonda 0,24, 500 µM olan konsantrasyonda 0,25, 1000 µM olan konsantrasyonda 0,25' dir. 4.günde ise kontrol grubunu değeri 0,19, 100 µM olan konsantrasyonda 0,12, 250 µM olan konsantrasyonda 0,12, 500 µM olan konsantrasyonda 0,11, 1000 µM olan konsantrasyonda 0,11' dir. (Şekil 1).



Şekil 1: Borik asitin sağlıklı lenfositler üzerine mitokondriyal aktivite açısından sitotoksik etkileri.

Anlamlılık değeri $P \leq 0,001^{***}$ olarak bulunmuştur. (n=8)

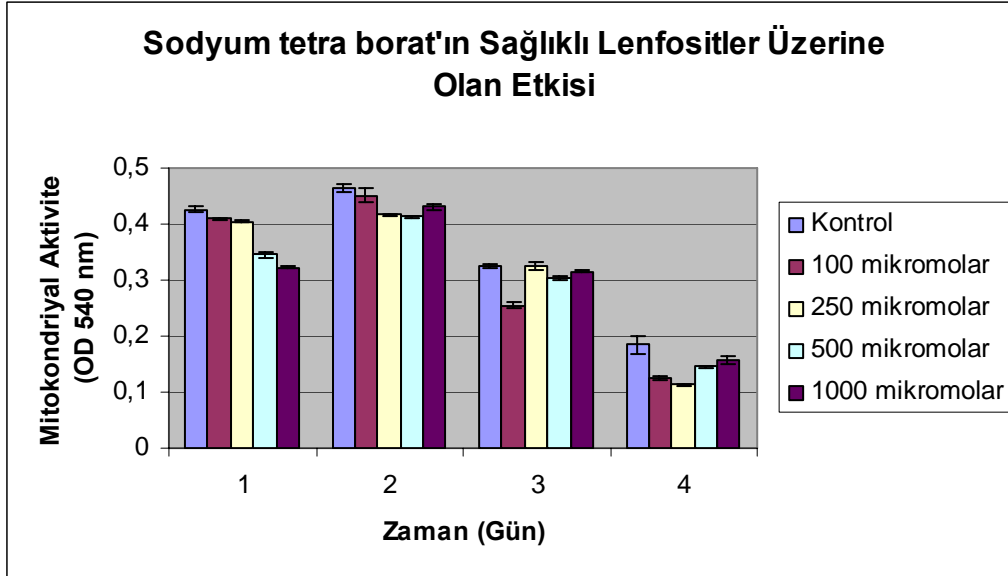
Tablo 1: Borik Asitin Sağlıklı İnsan Lenfositleri Üzerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (MTT)

Borik Asit 1.Gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	0,441	0,012	
100 µM	0,419	0,006	P≤ 0,01**
250 µM	0,368	0,020	P≤ 0,001***
500 µM	0,323	0,009	P≤ 0,001***
1000 µM	0,319	0,008	P≤ 0,001***
Borik Asit 2.Gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	0,436	0,020	
100 µM	0,383	0,014	P≤ 0,001***
250 µM	0,363	0,023	P≤ 0,001***
500 µM	0,315	0,006	P≤ 0,001***
1000 µM	0,313	0,011	P≤ 0,001***
Borik Asit 3.Gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	0,347	0,021	
100 µM	0,233	0,018	P≤ 0,001***
250 µM	0,222	0,011	P≤ 0,001***
500 µM	0,242	0,009	P≤ 0,001***
1000 µM	0,253	0,024	P≤ 0,001***
Borik Asit 4.Gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	0,197	0,020	
100 µM	0,122	0,014	P≤ 0,001***
250 µM	0,120	0,004	P≤ 0,001***
500 µM	0,114	0,008	P≤ 0,001***
1000 µM	0,119	0,008	P≤ 0,001***

En fazla toksik etki 1. ve 2. günde görüldü. 1. günde kontrol ve 100 µM olan konsantrasyon arasında $P \leq 0,01^{**}$ çok önemli derecede fark bulundu. 100 µM ile 250 µM, 500 µM, 1000 µM konsantrasyonlar arasında $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu. 2. günde ise 100 µM ve 250 µM konsantrasyonları arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu. 500 µM ile 1000 µM arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu. 100 µM, 500 ve 1000 µM konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu. Kontrol değeriyle, 100 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM olan konsantrasyonlar karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu. 3. ve 4. günlerde ise kontrol ve 100µM olan konsantrasyonlar arasında $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu. 250, 500 ve

1000 µM olan konsantrasyonlar arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu. Ancak kontrole karşı 500 ve 1000 µM olan konsantrasyonlar arasında $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu.

Sodyum tetra boratın sağlıklı insan lenfositleri üzerine uygulayıp MTT yöntemi ile değerlendirdiğimizde canlı hücre mitokondrilerinin absorbans değerlerini şöyle bulduk; 1.gün kontrol grubunu değeri 0,42, 100 µM olan konsantrasyonda 0,40, 250 µM olan konsantrasyonda 0,40, 500 µM olan konsantrasyonda 0,34, 1000 µM olan konsantrasyonda 0,32' dir. 2.günde kontrol grubunu değeri 0,46, 100 µM olan konsantrasyonda 0,45, 250 µM olan konsantrasyonda 0,41, 500 µM olan konsantrasyonda 0,41, 1000 µM olan konsantrasyonda 0,43'dür. 3.günde kontrol grubunu değeri 0,32, 100 µM olan konsantrasyonda 0,25, 250 µM olan konsantrasyonda 0,32, 500 µM olan konsantrasyonda 0,30, 1000 µM olan konsantrasyonda 0,31'dir. 4.günde ise kontrol grubunu değeri 0,18, 100 µM olan konsantrasyonda 0,12, 250 µM olan konsantrasyonda 0,11, 500 µM olan konsantrasyonda 0,14, 1000 µM olan konsantrasyonda 0,15' dir. (Şekil 2).



Şekil 2: Sodyum tetra boratın sağlıklı lenfositler üzerine mitokondriyal aktivite açısından sitotoksik etkileri. Anlamlılık değeri $P \leq 0,001^{***}$ olarak bulunmuştur. (n=8)

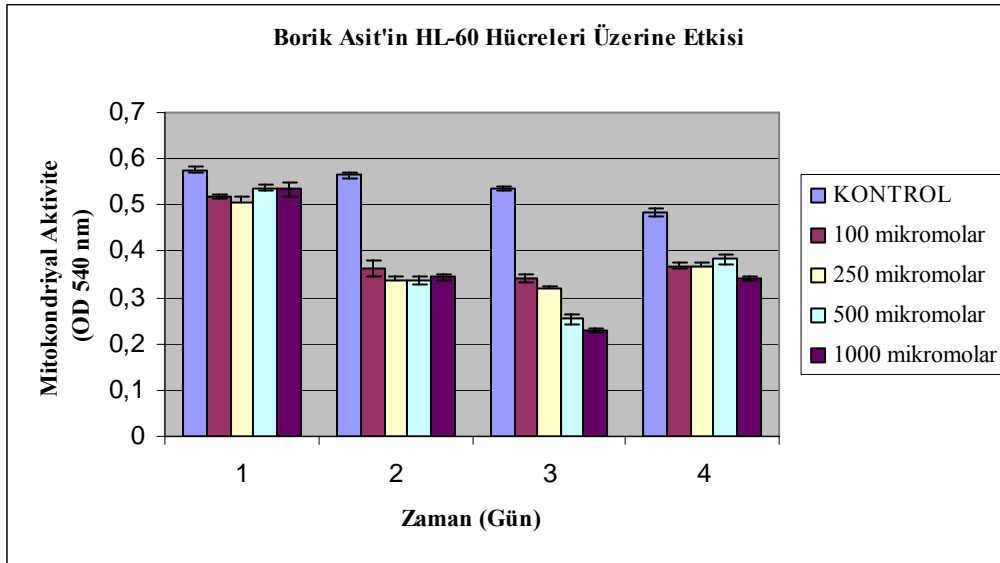
Tablo2: Sodyum tetra boratın Sağlıklı İnsan Lenfositleri Üzerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (MTT)

Sodyum tetra borat	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
1.Gün			
Kontrol	0,521	0,010	
100 µM	0,404	0,010	P≤ 0,001 ***
250 µM	0,409	0,053	P≤ 0,001 ***
500 µM	0,345	0,015	P≤ 0,001 ***
1000 µM	0,319	0,007	P≤ 0,001 ***
Sodyum tetra borat			
2.Gün			
Kontrol	0,460	0,019	
100 µM	0,450	0,033	p≥ 0,05
250 µM	0,416	0,009	P≤ 0,001 ***
500 µM	0,413	0,007	P≤ 0,001 ***
1000 µM	0,431	0,017	P≤ 0,001 ***
Sodyum tetra borat			
3.Gün			
Kontrol	0,324	0,013	
100 µM	0,254	0,013	P≤ 0,001 ***
250 µM	0,295	0,027	P≤ 0,01 **
500 µM	0,300	0,015	P≤ 0,05*
1000 µM	0,315	0,05	p≥ 0,05
Sodyum tetra borat			
4.Gün			
Kontrol	0,185	0,035	
100 µM	0,125	0,015	P≤ 0,001 ***
250 µM	0,113	0,006	P≤ 0,001 ***
500 µM	0,145	0,022	P≤ 0,01 **
1000 µM	0,156	0,019	p≥ 0,05

Kontrol değeri ile 100 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM olan konsantrasyonlar karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan p≤0,001*** ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur. 1. günde 100 µM ve 250 µM olan konsantrasyonlar p≥0,05 olarak bulunmuştur. 500 µM ve 1000 µM arasındaki anlamlılık istatistiksel açıdan p≤0,001*** ileri düzeyde anlamlı

bulunmuştur. 2. günde kontrol ile 100 µM olan konsantrasyon arasında $p \geq 0,05$ olarak bulunmuştur. 100 ve 250 µM arasında $P \leq 0,01^{**}$ olarak bulunmuştur. 500 ve 1000 µM arasında ise $p \geq 0,05$ olarak bulunmuştur. 3. günde 100 ve 250 µM arasında $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı, 500 ve 1000 µM arasında ise $p \geq 0,05$ olarak bulunmuştur.

Borik Asit'i HL-60 hücreleri üzerine uygulayıp MTT yöntemi ile değerlendirdiğimizde canlı hücrelerin mitokondrilerinin absorbans değerlerini şöyle bulduk; 1. gün kontrol grubunu değeri 0,57, 100 µM olan konsantrasyonda 0,51, 250 µM olan konsantrasyonda 0,50, 500 µM olan konsantrasyonda 0,53, 1000 µM olan konsantrasyonda 0,53'tür. 2. günde kontrol grubunu değeri 0,56, 100µM olan konsantrasyonda 0,36, 250 µM olan konsantrasyonda 0,33, 500 µM olan konsantrasyonda 0,33, 1000 µM olan konsantrasyonda 0,34'tür. 3. günde kontrol grubunu değeri 0,53, 100µM olan konsantrasyonda 0,34, 250 M olan konsantrasyonda 0,32, 500 µM olan konsantrasyonda 0,25, 1000 µM olan konsantrasyonda 0,22'dir. 4. günde ise kontrol grubunu değeri 0,48, 100 µM olan konsantrasyonda 0,36, 250 µM olan konsantrasyonda 0,36, 500 µM olan konsantrasyonda 0,38, 1000 M olan konsantrasyonda 0,34'tür. (Şekil 3).



Şekil 3: Borik asitin HL-60 hücreleri üzerine mitokondriyal aktivite açısından sitotoksik etkileri. Anlamlılık değeri $P \leq 0,001^{***}$ olarak bulunmuştur. (n=8)

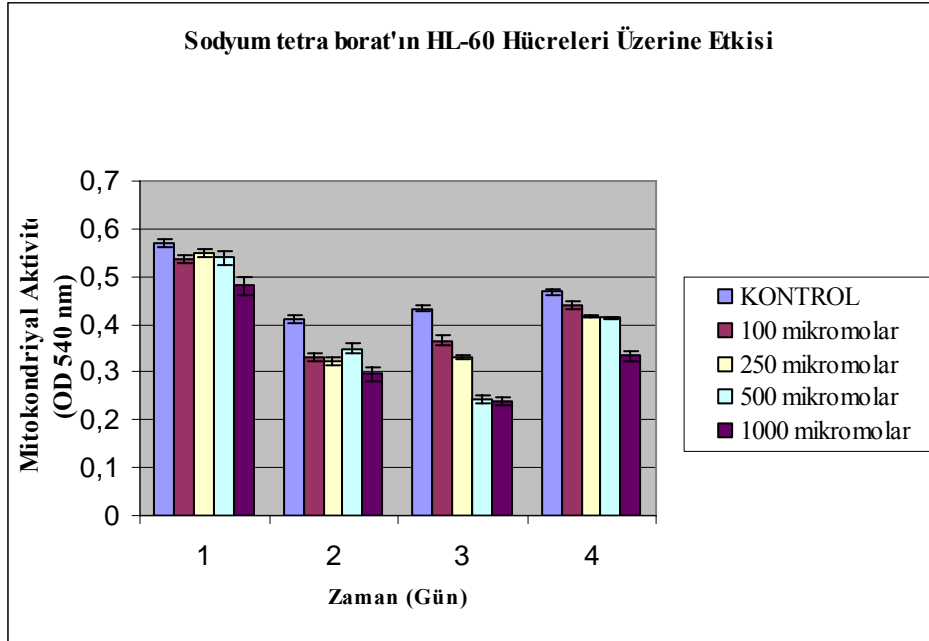
Tablo 3: Borik Asitin HL-60 Hücrelerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (MTT)

Borik Asit 1.Gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	0,576	0,019	
100 µM	0,518	0,008	$P \leq 0,001^{***}$
250 µM	0,503	0,046	$P \leq 0,001^{***}$
500 µM	0,537	0,021	$p \geq 0,05$
1000 µM	0,534	0,040	$p \geq 0,05$
Borik Asit 2.gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	0,564	0,018	
100 µM	0,362	0,48	$P \leq 0,001^{***}$
250 µM	0,338	0,020	$P \leq 0,001^{***}$
500 µM	0,338	0,024	$P \leq 0,001^{***}$
1000 µM	0,343	0,017	$P \leq 0,001^{***}$
Borik Asit 3.gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	0,535	0,014	
100 µM	0,340	0,025	$P \leq 0,001^{***}$
250 µM	0,321	0,008	$P \leq 0,001^{***}$
500 µM	0,253	0,031	$P \leq 0,001^{***}$
1000 µM	0,229	0,014	$P \leq 0,001^{***}$
Borik Asit 4.gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	0,484	0,021	
100 µM	0,368	0,018	$P \leq 0,001^{***}$
250 µM	0,368	0,024	$P \leq 0,001^{***}$
500 µM	0,382	0,025	$P \leq 0,001^{***}$
1000 µM	0,342	0,012	$P \leq 0,001^{***}$

Kontrol ve 100 µM, 250 µM olan dozlar arasında istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu. 500 µM ve 1000 µM olan konsantrasyonlar arasında 1. günde $p \geq 0,05$ olarak bulundu. 2. günde ise kontrol ve 100 µM, 250 µM, 500 µM ve 1000 µM olan konsantrasyonlar arasında istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu. 3. günde ise 100 µM ve 250 µM olan konsantrasyonlar arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu. 100 µM ve kontrol arasında, 100 µM ve 500 µM arasında, 100 µM ve 1000 µM arasında istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu. 500 ve 1000µM arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu. 4. günde ise kontrolün konsantrasyonlara göre anlamlılığı

istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu. Fakat 4. günde 100, 250, 500 ve 1000 μ M olan konsantrasyonlar arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu.

Sodyum tetra boratı HL-60 hücreleri üzerine uygulayıp MTT yöntemi ile değerlendirdiğimizde canlı hücrelerin mitokondrilerinin absorbans değerlerini şöyle bulduk; 1. gün kontrol grubunu değeri 0,57, 100 μ M olan konsantrasyonda 0,53, 250 μ M olan konsantrasyonda 0,54, 500 μ M olan konsantrasyonda 0,53, 1000 μ M olan konsantrasyonda 0,48' dir. 2. günde kontrol grubunu değeri 0,41, 100 μ M olan konsantrasyonda 0,32, 250 μ M olan konsantrasyonda 0,32, 500 μ M olan konsantrasyonda 0,34, 1000 μ M olan konsantrasyonda 0,29' dur. 3.günde kontrol grubunu değeri 0,43, 100 μ M olan konsantrasyonda 0,36, 250 μ M olan konsantrasyonda 0,33, 500 μ M olan konsantrasyonda 0,24, 1000 μ M olan konsantrasyonda 0,23'dir. 4.günde ise kontrol grubunu değeri 0,46, 100 μ M olan konsantrasyonda 0,43, 250 μ M olan konsantrasyonda 0,41, 500 μ M olan konsantrasyonda 0,41, 1000 μ M olan konsantrasyonda 0,33 'tür. (Şekil 4).



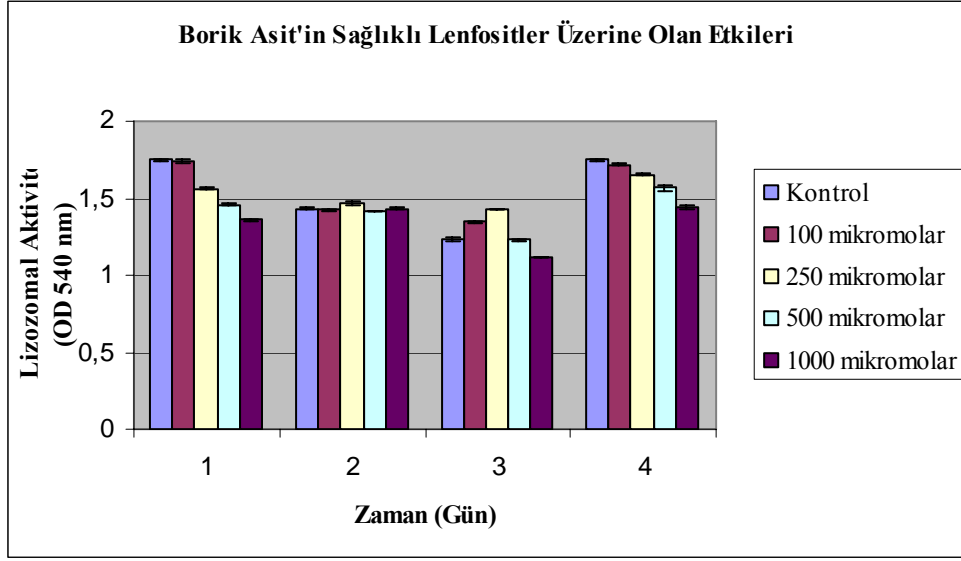
Şekil 4: Sodyum tetra boratın HL-60 hücreleri üzerine mitokondriyal aktivite açısından sitotoksik etkileri. Anlamlılık değeri $P \leq 0,001^{***}$ olarak bulunmuştur. (n=8)

Tablo 4: Sodyum tetra boratın HL-60 Hücrelerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (MTT)

Sodyum tetra borat	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
1.Gün			
Kontrol	0,570	0,019	
100 μ M	0,537	0,026	$p \geq 0,05$
250 μ M	0,549	0,020	$p \geq 0,05$
500 μ M	0,539	0,043	$p \geq 0,05$
1000 μ M	0,480	0,058	$P \leq 0,05^*$
Sodyum tetra borat			
2.Gün			
Kontrol	0,410	0,023	
100 μ M	0,329	0,024	$P \leq 0,001^{***}$
250 μ M	0,322	0,026	$P \leq 0,001^{***}$
500 μ M	0,349	0,034	$P \leq 0,01^{**}$
1000 μ M	0,295	0,037	$P \leq 0,001^{***}$
Sodyum tetra borat			
3.Gün			
Kontrol	0,432	0,016	
100 μ M	0,365	0,030	$P \leq 0,001^{***}$
250 μ M	0,330	0,013	$P \leq 0,001^{***}$
500 μ M	0,243	0,026	$P \leq 0,001^{***}$
1000 μ M	0,239	0,021	$P \leq 0,001^{***}$
Sodyum tetra borat			
borat4.Gün			
Kontrol	0,468	0,015	
100 μ M	0,439	0,021	$P \leq 0,05^*$
250 μ M	0,417	0,008	$P \leq 0,001^{***}$
500 μ M	0,334	0,007	$P \leq 0,001^{***}$
1000 μ M	0,414	0,028	$P \leq 0,001^{***}$

1. günde 100 µM ve 1000 µM arasında istatistiksel açıdan $p \leq 0,05^*$ gibi bir anlamlılık bulundu. 250 µM ve 1000 µM arasında $p \leq 0,01^{**}$, kontrol ve 1000 µM arasında ise istatistiksel açıdan $P \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde fark bulundu. 2. günde 100 µM ve kontrol arasında, 250 µM ve kontrol arasında, 500 µM ve kontrol arasında ve 500 µM ile 1000 µM arasında $P \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde fark bulundu. 3. günde 500 ve 1000 µM arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu. Diğer konsantrasyonlar arasında $P \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde fark bulundu. 4. günde ise 100 µM ile 500 ve 1000 µM arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu. Kontrol ile 100, 250, 500 ve 1000 µM olan konsantrasyonlar arasında $P \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde fark bulundu.

Borik Asiti sağlıklı insan lenfositleri üzerine uygulayıp Neutral Red yöntemi ile değerlendirdiğimizde canlı hücrelerin lizozomal aktivite absorbands değerlerini şöyle bulduk; 1.gün kontrol grubunu değeri 1,74, 100 µM olan konsantrasyonda 1,74, 250 µM olan konsantrasyonda 1,56, 500 µM olan konsantrasyonda 1,45, 1000 µM olan konsantrasyonda 1,35' dir. 2. günde kontrol grubunu değeri 1,43, 100 µM olan konsantrasyonda 1,42, 250 µM olan konsantrasyonda 1,46, 500 µM olan konsantrasyonda 1,41, 1000 µM olan konsantrasyonda 1,43' dür. 3. günde kontrol grubunu değeri 1,23, 100 µM olan konsantrasyonda 1,34, 250 µM olan konsantrasyonda 1,42, 500 µM olan konsantrasyonda 1,22, 1000 µM olan konsantrasyonda 1,11' dir. 4. günde ise kontrol grubunu değeri 1,74, 100 µM olan konsantrasyonda 1,71, 250 µM olan konsantrasyonda 1,65, 500 µM olan konsantrasyonda 1,56, 1000 µM olan konsantrasyonda 1,44' tür. (Şekil 5).



Şekil 5: Borik asitin sağlıklı lenfositler üzerine lizozomal aktivite açısından sitotoksik etkileri. Anlamlılık değeri $P \leq 0,001^{***}$ olarak bulunmuştur. (n=8)

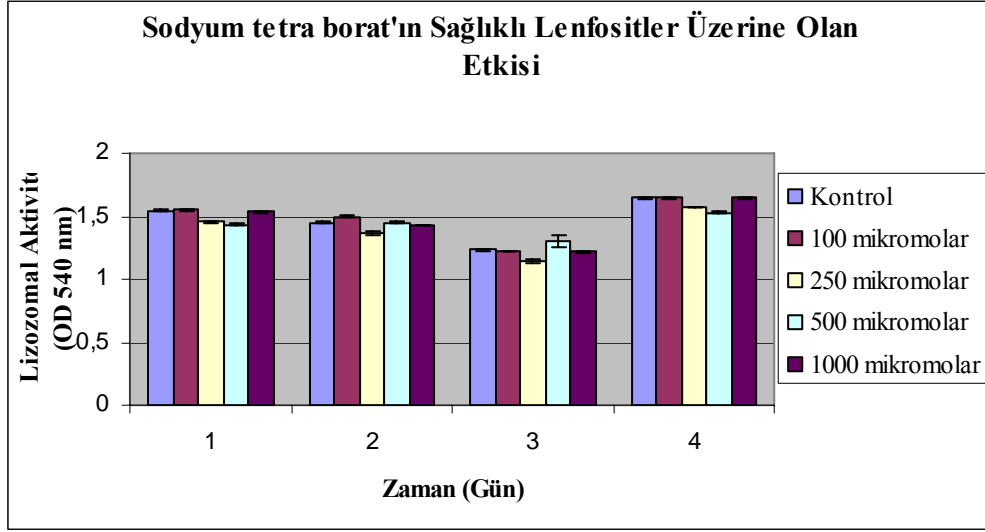
Tablo 5: Borik Asitin Sağlıklı İnsan Lenfositleri Üzerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (Neutral Red)

Borik Asit 1.Gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	1,748	0,027	
100 μM	1,745	0,032	$p \geq 0,05$
250 μM	1,561	0,022	$P \leq 0,001^{***}$
500 μM	1,459	0,026	$P \leq 0,001^{***}$
1000 μM	1,358	0,019	$P \leq 0,001^{***}$
Borik Asit 2.Gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	1,433	0,026	
100 μM	1,422	0,010	$p \geq 0,05$
250 μM	1,467	0,023	$P \leq 0,01^{**}$
500 μM	1,414	0,008	$p \geq 0,05$
1000 μM	1,433	0,023	$p \geq 0,05$
Borik Asit 3.Gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	1,233	0,025	
100 μM	1,347	0,023	$P \leq 0,001^{***}$
250 μM	1,428	0,014	$P \leq 0,001^{***}$
500 μM	1,227	0,013	$p \geq 0,05$
1000 μM	1,114	0,008	$P \leq 0,001^{***}$
Borik Asit 4.Gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	1,749	0,026	

100 µM	1,719	0,021	$p \geq 0,05$
250 µM	1,654	0,025	$P \leq 0,001^{***}$
500 µM	1,567	0,051	$P \leq 0,001^{***}$
1000 µM	1,444	0,027	$P \leq 0,001^{***}$

1. günde kontrol ve 100 µM olan konsantrasyonlar arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu. Kontrol ve 250 µM, 500 µM, 1000 µM arasında istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu. 2. günde 100 ve 250 M arasında, 250 ve 500 µM arasında, 250 ile 1000 µM arasında $P \leq 0,01$ olarak bulundu. 3. günde kontrol ve 100, 250, 1000 µM olan konsantrasyonlar arasında $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu, kontrol ve 500µM olan konsantrasyonlar arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu. 4.günde kontrol ve 100 µM olan konsantrasyonlar arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu, 100,250 ve 500 µM arasında $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu.

Sodyum tetra boratın sağlıklı insan lenfositleri üzerine uygulayıp Neutral Red yöntemi ile değerlendirdiğimizde canlı hücrelerin lizozomal aktivite absorbans değerlerini şöyle bulduk; 1.gün kontrol grubunu değeri 1,54, 100 µM olan konsantrasyonda 1,55, 250 µM olan konsantrasyonda 1,45, 500 µM olan konsantrasyonda 1,43, 1000 µM olan konsantrasyonda 1,53' dir. 2.günde kontrol grubunu değeri 1,44, 100 µM olan konsantrasyonda 1,49, 250 µM olan konsantrasyonda 1,36, 500 µM olan konsantrasyonda 1,45, 1000 µM olan konsantrasyonda 1,43' dür. 3.günde kontrol grubunu değeri 1,23, 100 µM olan konsantrasyonda 1,22, 250 µM olan konsantrasyonda 1,14, 500 µM olan konsantrasyonda 1,30, 1000 µM olan konsantrasyonda 1,21'dir. 4.günde ise kontrol grubunu değeri 1,64, 100 µM olan konsantrasyonda 1,64, 250 µM olan konsantrasyonda 1,57, 500 µM olan konsantrasyonda 1,53, 1000 µM olan konsantrasyonda 1,64' tür. (Şekil 6).

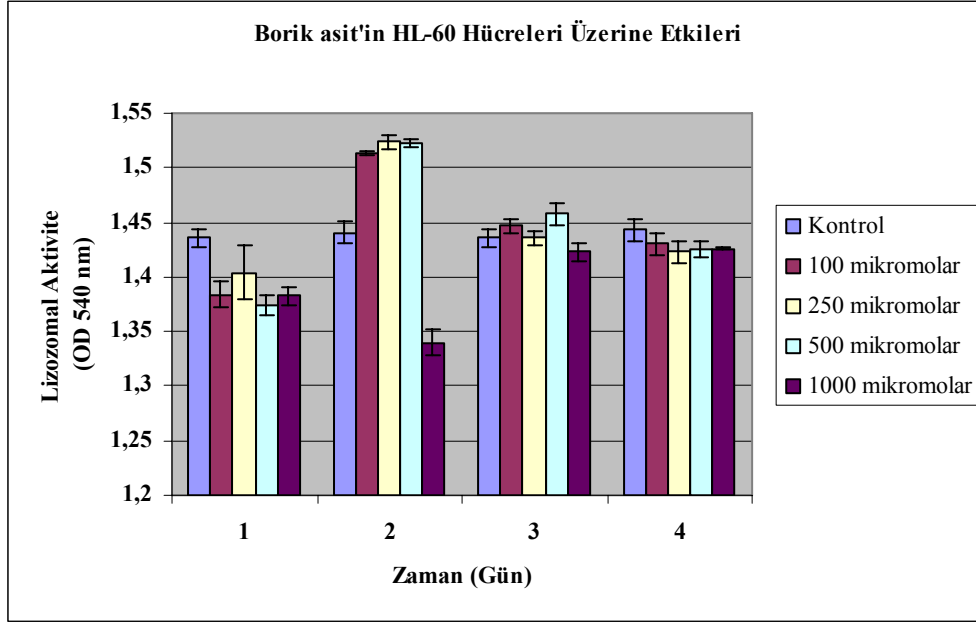


Şekil 6: Sodyum tetra boratın sağlıklı lenfositler üzerine lizozomal aktivite açısından sitotoksik etkileri. Anlamlılık değeri $P \leq 0,001^{***}$ olarak bulunmuştur. (n=8)

Kontrol ve 250 μM ve 500 μM arasında istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu. Kontrol ve 100 μM ve 1000 μM arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu. 2. günde 500 ve 1000 μM arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu. 3. günde 250 ve 500 μM olan konsantrasyonlar arasında $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu. 4. günde ise kontrol ve 100 ve 1000 μM arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu. 100 μM olan konsantrasyonlar 250 ve 500 μM olan konsantrasyonlar arasında $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde anlamlı bulundu. Borik Asit'i HL-60 hücreleri üzerine uygulayıp Neutral Red yöntemi ile değerlendirdiğimizde canlı hücrelerin lizozomal aktivite absorbans değerlerini şöyle bulduk; 1.gün kontrol grubunu değeri 1,43, 100 μM olan konsantrasyonda 1,38, 250 μM olan konsantrasyonda 1,40, 500 μM olan konsantrasyonda 1,37, 1000 μM olan konsantrasyonda 1,38' dir. 2.günde kontrol grubunu değeri 1,44, 100 μM olan konsantrasyonda 1,51, 250 μM olan konsantrasyonda 1,52, 500 μM olan konsantrasyonda 1,52, 1000 μM olan konsantrasyonda 1,34' dür. 3.günde kontrol grubunu değeri 1,43, 100 μM olan konsantrasyonda 1,44, 250 μM olan konsantrasyonda 1,43, 500 μM olan konsantrasyonda 1,45, 1000 μM olan konsantrasyonda 1,42' dir. 4.günde ise kontrol grubunu değeri 1,44, 100 μM olan konsantrasyonda 1,43, 250 μM olan konsantrasyonda 1,42, 500 μM olan konsantrasyonda 1,42, 1000 μM olan konsantrasyonda 1,42' dir (Şekil 7).

Tablo 6: Sodyum tetra boratın Sağlıklı İnsan Lenfositleri Üzerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (Neutral Red)

Sodyum tetra borat	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
1.Gün			
Kontrol	1,547	0,024	
100 µM	1,551	0,023	$p \geq 0,05$
250 µM	1,458	0,022	$P \leq 0,001^{***}$
500 µM	1,432	0,014	$P \leq 0,001^{***}$
1000 µM	1,534	0,016	$p \geq 0,05$
Sodyum tetra borat			
2.Gün			
Kontrol	1,446	0,026	
100 µM	1,499	0,005	$P \leq 0,001^{***}$
250 µM	1,362	0,029	$P \leq 0,001^{***}$
500 µM	1,451	0,025	$p \geq 0,05$
1000 µM	1,431	0,013	$p \geq 0,05$
Sodyum tetra borat			
3.Gün			
Kontrol	1,230	0,009	
100 µM	1,220	0,008	$p \geq 0,05$
250 µM	1,147	0,043	$p \geq 0,05$
500 µM	1,301	0,129	$p \geq 0,05$
1000 µM	1,217	0,026	$p \geq 0,05$
Sodyum tetra borat			
4.Gün			
Kontrol	1,646	0,018	
100 µM	1,645	0,022	$p \geq 0,05$
250 µM	1,572	0,018	$P \leq 0,001^{***}$
500 µM	1,530	0,013	$P \leq 0,001^{***}$
1000 µM	1,645	0,025	$p \geq 0,05$



Şekil 7: Borik asit'in HL-60 hücreleri üzerine lizozomal aktivite açısından sitotoksik etkileri. Anlamlılık değeri $P \leq 0,05^*$ olarak bulunmuştur. (n=8)

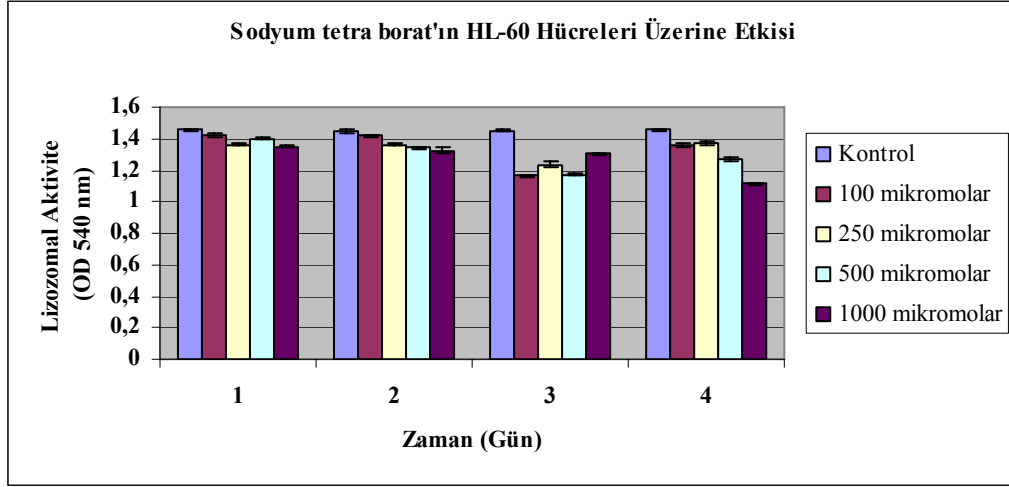
Tablo 7: Borik Asit'in HL-60 Hücrelerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (Neutral Red)

Borik Asit 1.Gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	1,435	0,024	
100 μ M	1,383	0,032	$p \geq 0,05$
250 μ M	1,403	0,069	$p \geq 0,05$
500 μ M	1,374	0,026	$P \leq 0,05^*$
1000 μ M	1,382	0,021	$p \geq 0,05$
Borik Asit 2.gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	1,440	0,029	
100 μ M	1,512	0,004	$P \leq 0,001^{***}$
250 μ M	1,523	0,017	$P \leq 0,001^{***}$
500 μ M	1,522	0,010	$P \leq 0,001^{***}$
1000 μ M	1,340	0,032	$P \leq 0,001^{***}$
Borik Asit 3.gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	1,436	0,022	
100 μ M	1,446	0,017	$p \geq 0,05$
250 μ M	1,436	0,019	$p \geq 0,05$

500 μM	1,457	0,027	$p \geq 0,05$
1000 μM	1,422	0,025	$p \geq 0,05$
Borik Asit 4.gün	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
Kontrol	1,443	0,018	
100 μM	1,340	0,037	$P \leq 0,001^{***}$
250 μM	1,322	0,028	$P \leq 0,001^{***}$
500 μM	1,425	0,008	$p \geq 0,05$
1000 μM	1,425	0,014	$p \geq 0,05$

1. günde kontrol ve 500 μM arasında istatistiksel açıdan $p \leq 0,05^*$ gibi bir anlamlılık bulundu. Diğer konsantrasyonlar arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundur. 2. günde 100 ve 1000 μM arasında $p \leq 0,001^{***}$ gibi bir anlamlılık bulundu. 3. günde sadece 500 ve 1000 μM olan konsantrasyonlar arasında $p \leq 0,001^{***}$ gibi bir anlamlılık bulundu. 4. günde ise 100 ile 500 ve 1000 μM olan konsantrasyonlar arasında $p \leq 0,001^{***}$ gibi bir anlamlılık bulundu. 500 ve 1000 μM arasında ise $p \geq 0,05$ olarak bulundu.

Sodyum tetra borat'ı HL-60 hücreleri üzerine uygulayıp Neutral Red yöntemi ile değerlendirdiğimizde canlı hücrelerin lizozomal aktivite absorbands değerlerini şöyle bulduk; 1.gün kontrol grubunu değeri 1,45, 100 μM olan konsantrasyonda 1,42, 250 μM olan konsantrasyonda 1,36, 500 μM olan konsantrasyonda 1,40, 1000 μM olan konsantrasyonda 1,34' dür. 2.günde kontrol grubunu değeri 1,44, 100 μM olan konsantrasyonda 1,41, 250 μM olan konsantrasyonda 1,36, 500 μM olan konsantrasyonda 1,34, 1000 μM olan konsantrasyonda 1,32' dir. 3.günde kontrol grubunu değeri 1,45, 100 μM olan konsantrasyonda doz 1,16, 250 μM olan konsantrasyonda 1,23, 500 μM olan konsantrasyonda 1,17, 1000 μM olan konsantrasyonda 1,30' dur. 4.günde ise kontrol grubunu değeri 1,45, 100 μM olan konsantrasyonda 1,35, 250 μM olan konsantrasyonda 1,36, 500 μM olan konsantrasyonda 1,27, 1000 μM olan konsantrasyonda 1,11' dir (Şekil 8).



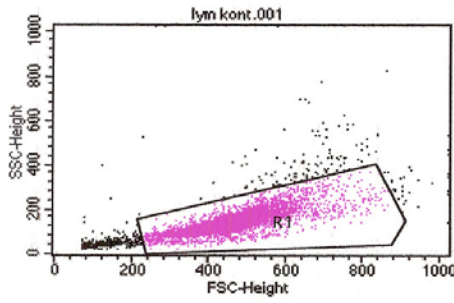
Şekil 8: Sodyum tetra boratın HL-60 hücreleri üzerine lizozomal aktivite açısından sitotoksik etkileri. Anlamlılık değeri $P \leq 0,001^*$ olarak bulunmuştur. (n=8)

1.günde kontrol ve 100 μM olan konsantrasyonda $p \geq 0,05$ olarak bulundu. 250 μM , 500 μM , 1000 μM olan konsantrasyonlar ve kontrol arasında istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ gibi bir anlamlılık bulundu. 2.günde kontrol ve 100 μM arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu. 100 μM ile 500 μM ve 1000 μM arasında $p \leq 0,001^{***}$ gibi bir anlamlılık bulundu. 500 ve 1000 μM arasında $p \geq 0,05$ olarak bulundu. 4. günde ise 100 ile 500 ve 1000 μM arasında istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ gibi bir anlamlılık bulundu.

Tablo 8: Sodyum tetra boratın HL-60 Hücrelerine Olan Etkisinin İstatistiksel Sonuçları (Neutral Red)

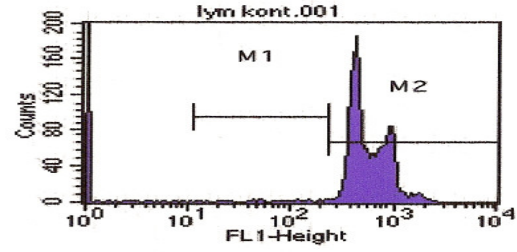
Sodyum tetra borat	Ortalama	Standart Sapma	Anlamlılık Değeri
1.Gün			
Kontrol	1,457	0,019	
100 µM	1,420	0,031	$p \geq 0,05$
250 µM	1,364	0,025	$P \leq 0,001^{***}$
500 µM	1,401	0,029	$P \leq 0,001^{***}$
1000 µM	1,349	0,024	$P \leq 0,001^{***}$
Sodyum tetra borat			
2.Gün			
Kontrol	1,447	0,038	
100 µM	1,418	0,068	$p \geq 0,05$
250 µM	1,362	0,024	$P \leq 0,001^{***}$
500 µM	1,340	0,013	$P \leq 0,001^{***}$
1000 µM	1,325	0,047	$P \leq 0,001^{***}$
Sodyum tetra borat			
3.Gün			
Kontrol	1,453	0,025	
100 µM	1,165	0,026	$P \leq 0,001^{***}$
250 µM	1,235	0,046	$P \leq 0,001^{***}$
500 µM	1,170	0,023	$P \leq 0,001^{***}$
1000 µM	1,305	0,011	$P \leq 0,001^{***}$
Sodyum tetra borat			
4.Gün			
Kontrol	1,454	0,027	
100 µM	1,359	0,027	$P \leq 0,001^{***}$
250 µM	1,369	0,028	$P \leq 0,001^{***}$
500 µM	1,270	0,021	$P \leq 0,001^{***}$
1000 µM	1,112	0,002	$P \leq 0,001^{***}$

Borik asit'i sağlıklı lenfositler üzerinde akridin oranj boyası kullanılarak akış hücremetrede değerlendirildiğinde; kontrol olarak kullandığımız sağlıklı lenfositlere borik asit uyguladığımızda kontrol de canlı hücre yüzdesini % 95,9; yüzde apoptotik oranı % 0,8, 100 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini % 92,4; yüzde apoptotik oranı % 1,3, 250 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %90,4; apoptotik hücre oranını % 1,8; 500 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %87,3; yüzde apoptotik oranı % 3,8, 1000 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %85,9; yüzde apoptotik oran % 2,5 olarak bulundu(Şekil 9).



File: lym kont.001

Gate	% Gated
G1	94.57

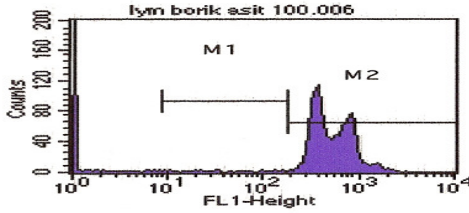


File: lym kont.001

Patient ID:

X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Marker	Left	Right	% Gated
All	1	9910	100.00
M1	11	229	0.79
M2	229	9910	95.92

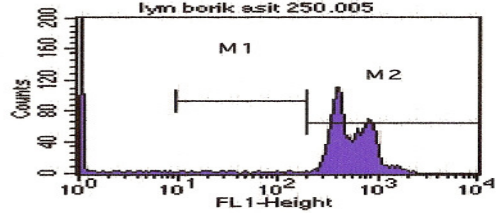


File: lym borik asit 100.006

Patient ID:

X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Marker	Left	Right	% Gated
All	1	9910	100.00
M1	9	179	1.23
M2	179	9910	92.48

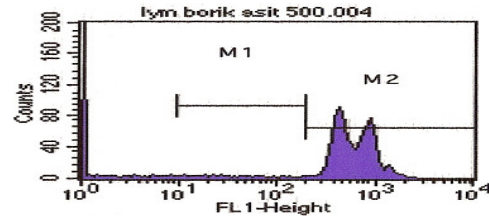


File: lym borik asit 250.005

Patient ID:

X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Marker	Left	Right	% Gated
All	1	9910	100.00
M1	9	191	1.66
M2	191	9910	90.47

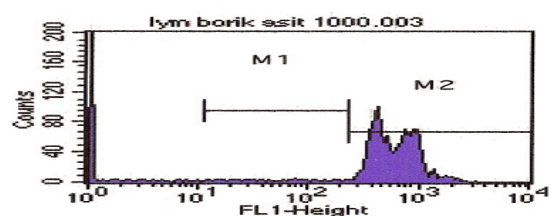


File: lym borik asit 500.004

Patient ID:

X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Marker	Left	Right	% Gated
All	1	9910	100.00
M1	9	191	3.47
M2	191	9910	87.30



File: lym borik asit 1000.003

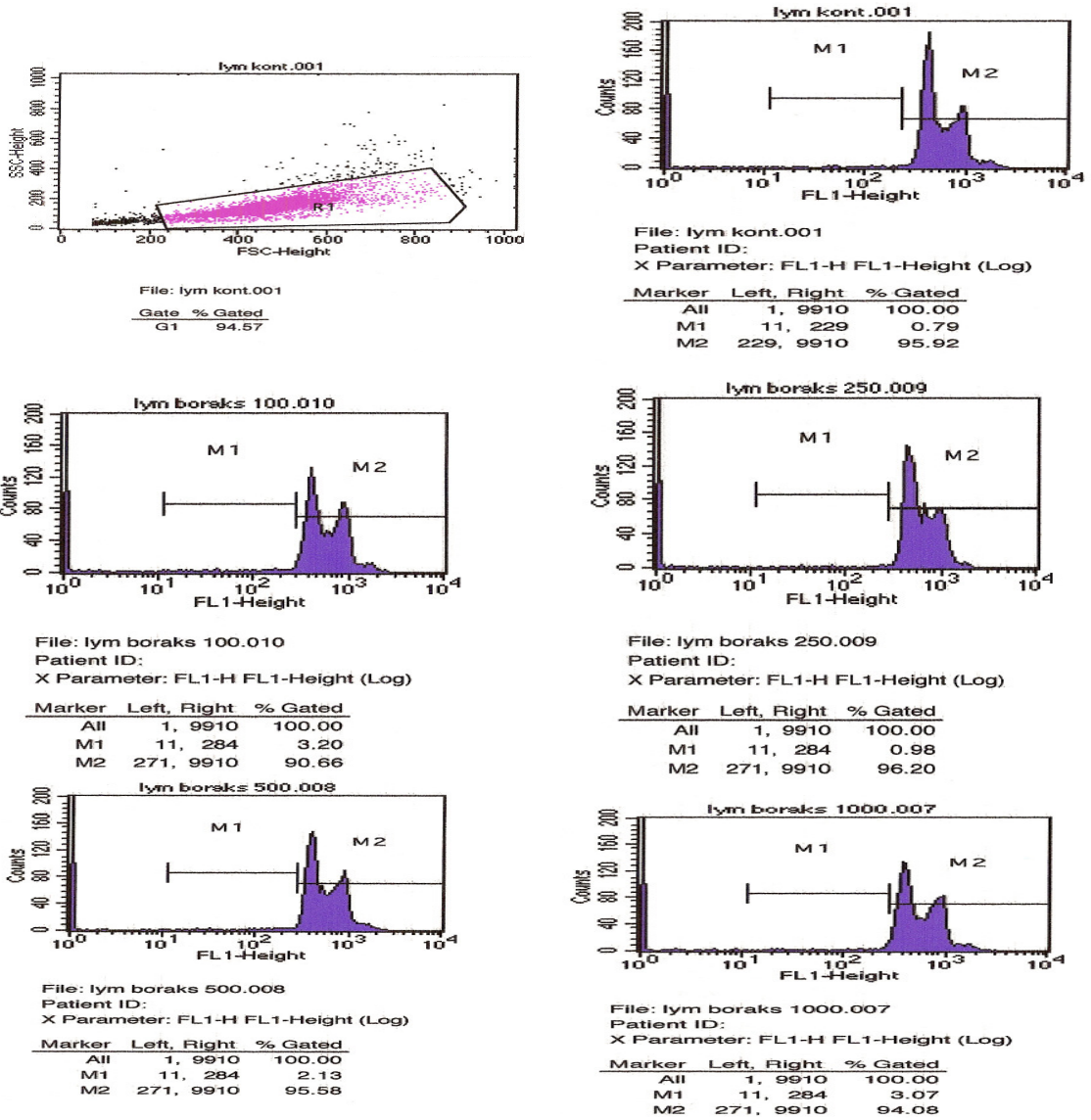
Patient ID:

X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Marker	Left	Right	% Gated
All	1	9910	100.00
M1	11	229	2.27
M2	229	9910	85.97

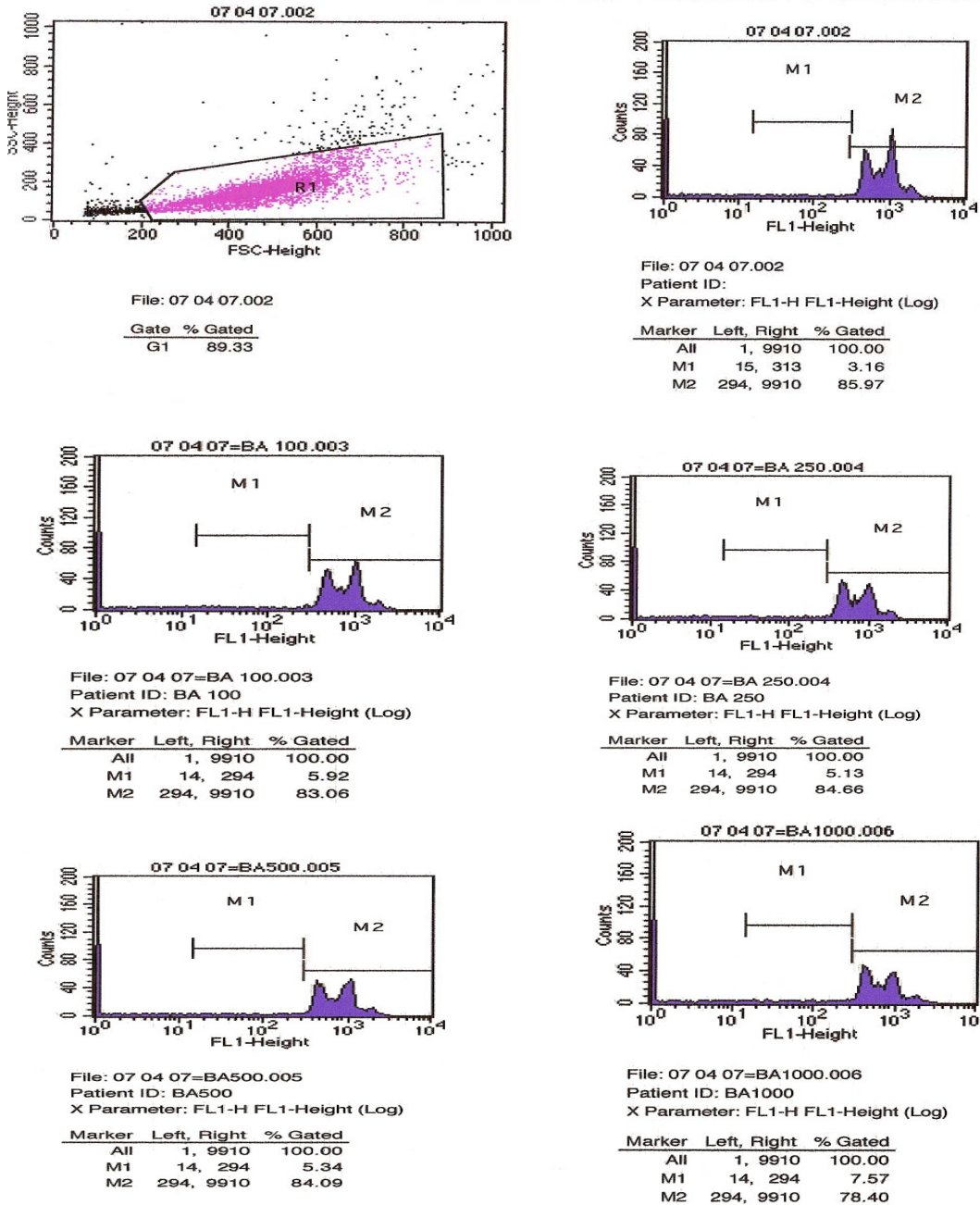
Şekil 9: Borik Asitin sağlıklı lenfositler üzerine olan etkisinin akış sitometride değerlendirilmesi

Sodyum tetra borat'ı(boraks) sağlıklı lenfositlere uyguladığımızda akrinin oranj boyasıyla akış hücremetrede; kontrolde canlı hücre yüzdesini %95,9; yüzde apoptotik oranı % 0,8; 100 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %90,66; yüzde apoptotik oranı % 3,4; 250 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %96,2; yüzde apoptotik oranı % 1,0; 500 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %95,5; yüzde apoptotik oranı % 2,1; 1000 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %94,08; yüzde apoptotik oranı % 3,1 olarak bulundu(Şekil 10).



Şekil 10: Sodyum tetra boratın sağlıklı lenfositler üzerine olan etkisinin akım sitometriyle değerlendirilmesi

Borik asit'i HL-60 hücrelerine uyguladığımızda akridin oranj boyasıyla akış hücremetrede; kontrol de canlı hücre yüzdesini %85,9; yüzde apoptotik oran % 3,5, 100 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %83,06; yüzde apoptotik oran % 6,6, 250 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %84,66; yüzde apoptotik oran % 5,7; 500 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %84,09; apoptotik oran % 5,9; 1000 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %78,4; yüzde apoptotik oran %8,8 olarak bulundu (Şekil 11).

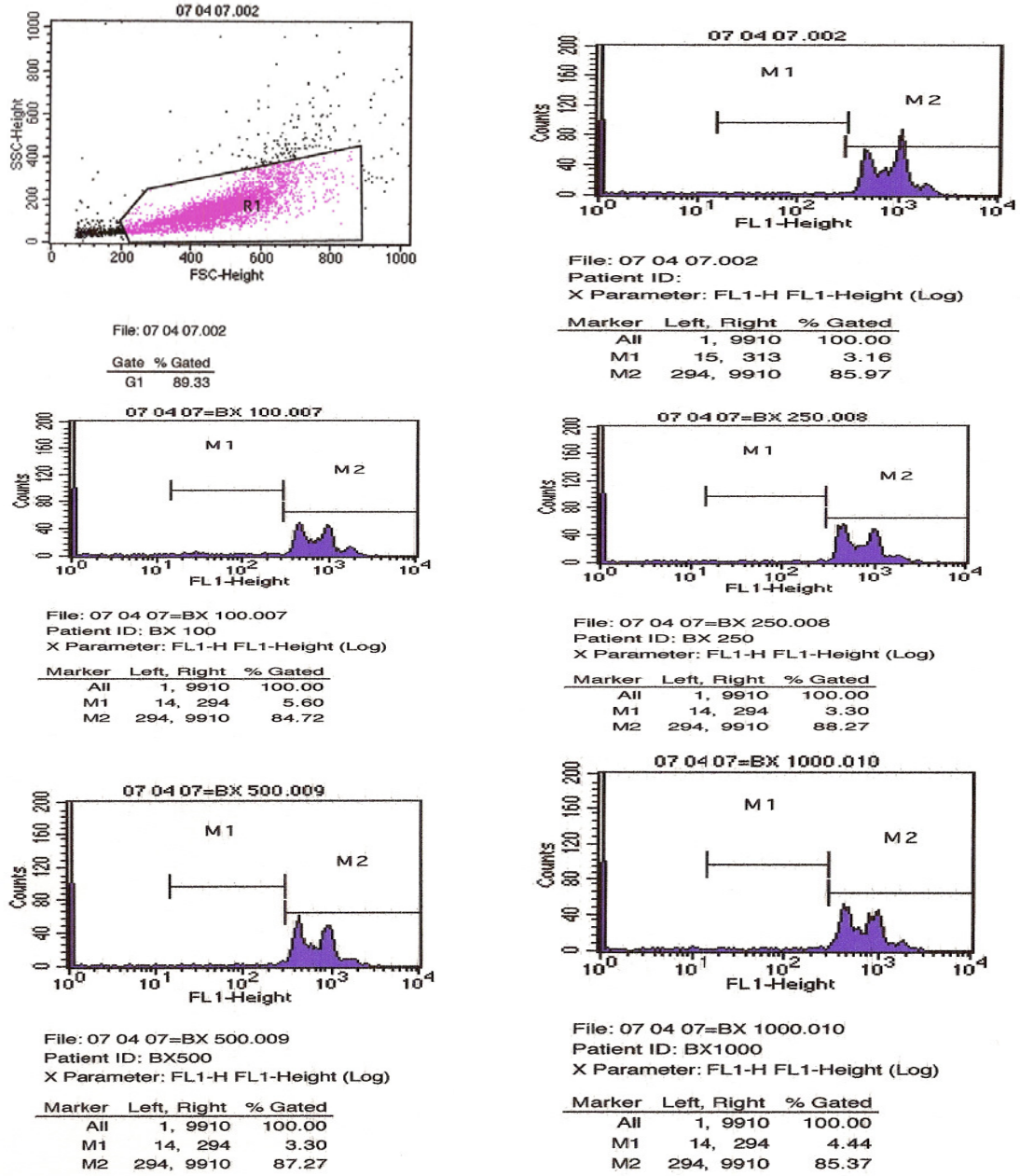


Şekil 11: Borik asitin HL-60 hücrelerine olan etkisinin akım sitometride değerlendirilmesi

Tablo 9: Sağlıklı Lenfositlere ve HL-60 Hücrelerine Borik Asitin Apoptotik Etkisi

	Apoptotik Hücre Yüzdesi	Canlı Hücre Yüzdesi	% Apoptotik Oran
Lenfosit Borik Asit Kontrol	0,79	95,9	0,8
Lenfosit Borik Asit 100 mikromolar	1,23	92,8	1,3
Lenfosit Borik Asit 250 mikromolar	1,66	90,4	1,8
Lenfosit Borik Asit 500 mikromolar	3,47	87,3	3,8
Lenfosit Borik Asit 1000 mikromolar	2,27	85,9	2,5
HL-60 Borik Asit Kontrol	3,16	85,9	3,5
HL-60 Borik Asit 100 mikromolar	5,92	83,06	6,6
HL-60 Borik Asit 250 mikromolar	5,13	84,66	5,7
HL-60 Borik Asit 500 mikromolar	5,34	84,09	5,9
HL-60 Borik Asit 1000 mikromolar	7,57	78,4	8,8

Sodyum tetra borat'ı(boraks) akut lösemi hücrelerine uyguladığımızda akrinin oranj boyasıyla akış hücremetre değerlendirdiğimizde kontrolde canlı hücre yüzdesini %85,9; yüzde apoptotik oran % 3,5; 100 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %84,72; yüzde apoptotik oran % 6,2; 250 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %88,2; yüzde apoptotik oran % 3,6; 500 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %87,2; yüzde apoptotik oran % 3,6; 1000 μ M olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %85,3; yüzde apoptotik oran % 4,9 olarak bulundu (Şekil 12).



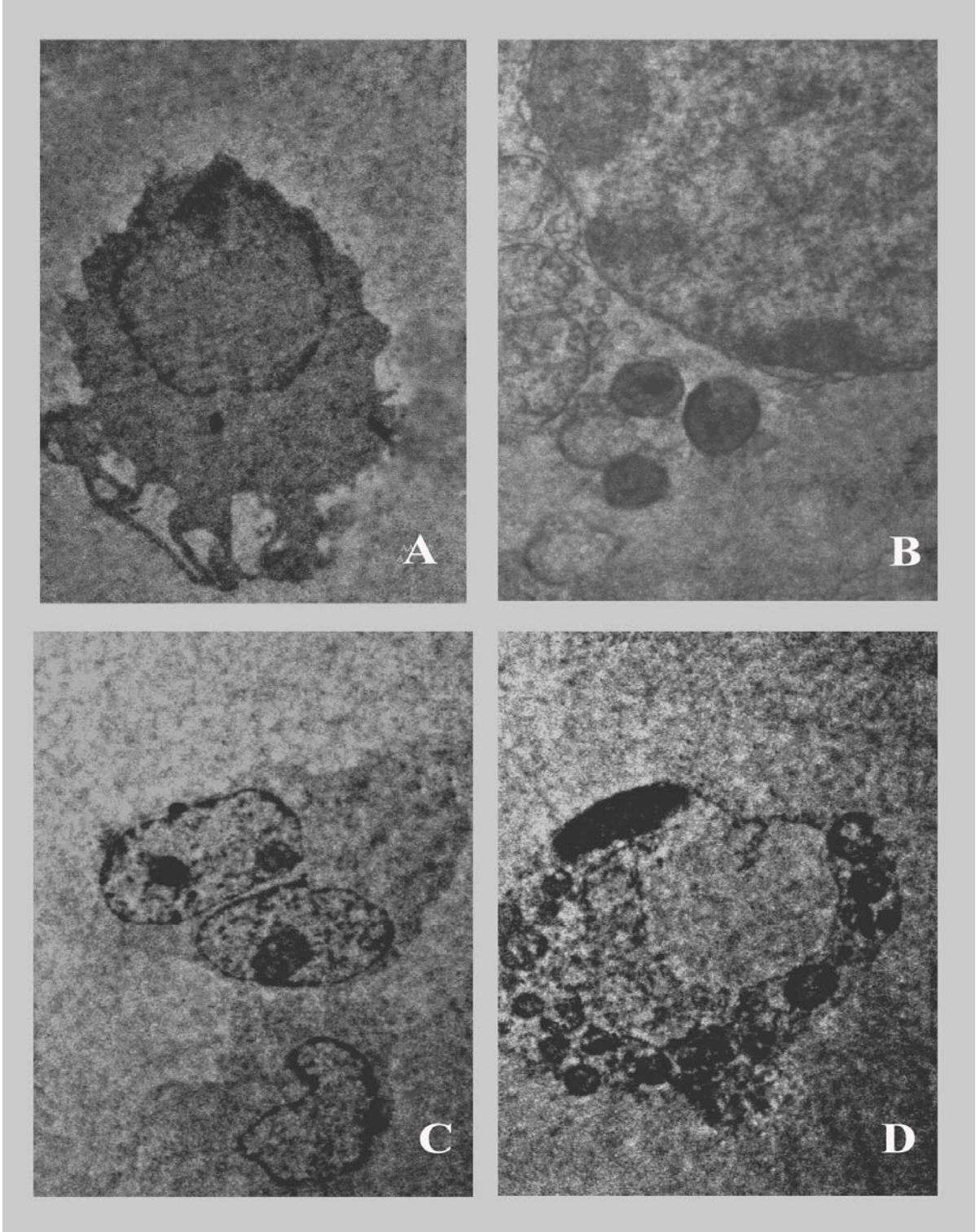
Şekil 12:Sodyum tetra boratın HL-60 hücreleri üzerine olan etkisinin akım sitometride değerlendirilmesi

Tablo 10: Sağlıklı Lenfositlere ve HL-60 Hücrelerine Sodyum tetra boratın (boraks) Apoptotik Etkisi

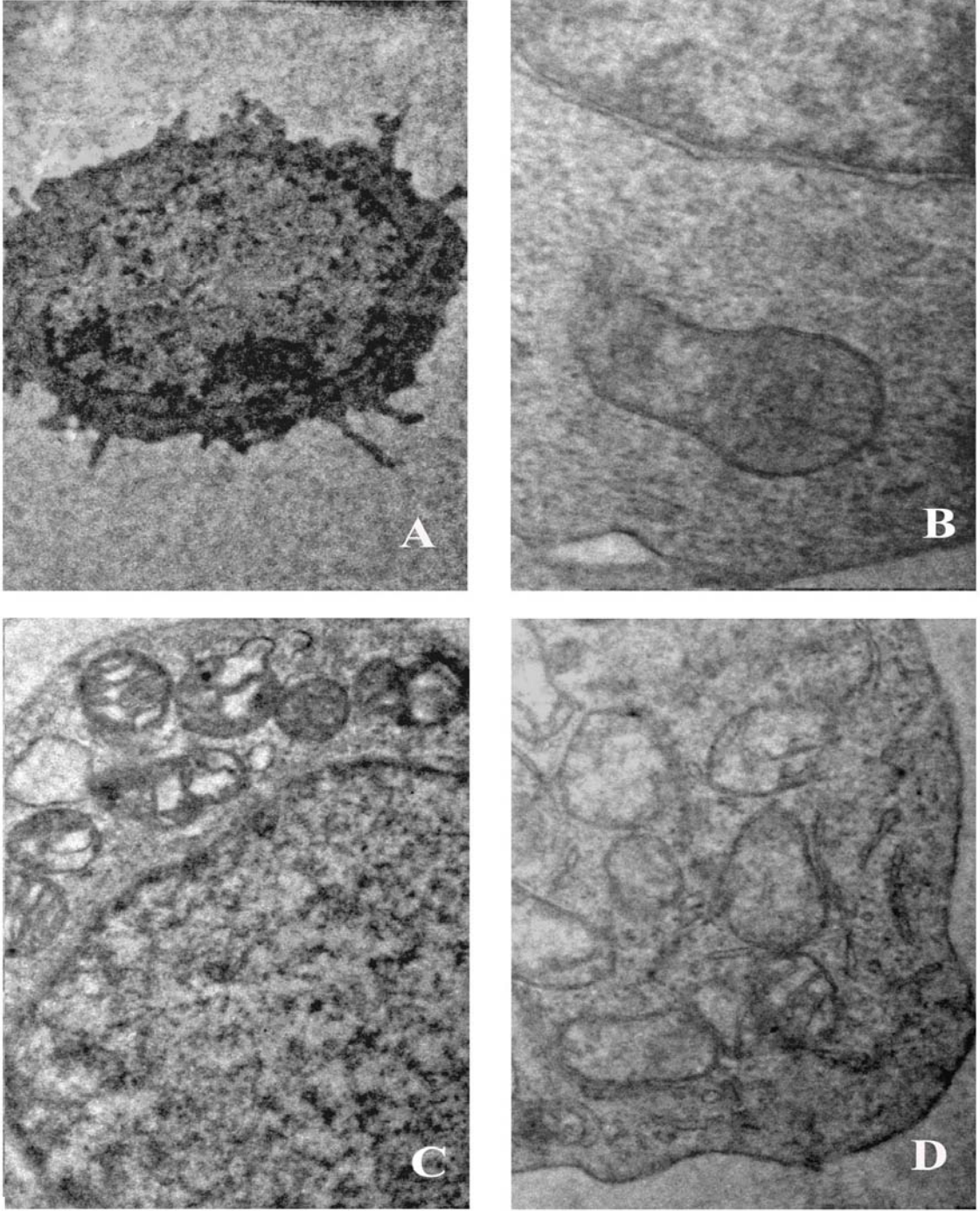
	Apoptotik Hücre Yüzdesi	Canlı Hücre Yüzdesi	% Apoptotik Oran
Lenfosit Sodyum tetra borat Kontrol	0,79	95,8	0,8
Lenfosit Sodyum tetra borat 100 mikromolar	3,20	90,66	3,4
Lenfosit Sodyum tetra borat 250 mikromolar	0,98	96,2	1,0
Lenfosit Sodyum tetra borat 500 mikromolar	2,13	95,58	2,1
Lenfosit Sodyum tetra borat 1000 mikromolar	3,07	94,08	3,1
HL-60 Sodyum tetra borat Kontrol	3,16	85,9	3,5
HL-60 Sodyum tetra borat 100 mikromolar	5,60	84,72	6,2
HL-60 Sodyum tetra borat 250 mikromolar	3,30	88,2	3,6
HL-60 Sodyum tetra borat 500 mikromolar	3,30	87,2	3,6
HL-60 Sodyum tetra borat 1000 mikromolar	4,44	85,3	4,9

Sağlıklı lenfositlere borik asit uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu(TEM) ile elde edilen bulgular şöyledir; 100 μM uygulanan konsantrasyonda kontrol grubuyla aynı görüntüler elde edilmiştir. Bu nedenle görüntü olarak bulunmamaktadır. Kontrol grubunda genetik materyal perinuklear alanda homojen bir şekilde dağılmıştır. Savunmada ve salgılamada görevli sitoplazmik uzantılar spesifik şekliyle görüntülenebilmiştir. 250 μM borik asit'e maruz kalan grup da sekonder lizozom oluşumları ortaya çıkmış, mitokondriler şekillerini yitirmeye başlamıştır. 500 μM borik asit uygulanan lenfosit grubunda mikronükleus oluşumlar gözlenmiş, hücre çekirdeği spesifik şeklini yitirmiştir. 1000 μM borik aside maruz kalan lenfositlerde ise hücre zarı etrafında apoptotik cisimcikler oluşmuş ve hücre çekirdeği tamamen kenara itilmiş, organeller tam olarak görüntülenemedi (Fotoğraf 1).

Sağlıklı lenfositlere sodyum tetra borat uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile elde edilen bulgular şöyledir; 100 μM uygulanan konsantrasyonda da kontrol grubuyla aynı görüntüler elde edilmiştir. Bu nedenle görüntü olarak bulunmamaktadır. Mitokondriler normal hücresel yapılarını korumuşlardır. Kristalların yapısında herhangi bir deformasyon gözlenmedi. Çekirdek zarı bütünlüğünü korumuştur. 250 μM sodyum tetra borata maruz kalan lenfosit grubunda ise mitokondri spesifik şeklinde değişimler, kristalların normal düzeninde azalmalar görüldü. 500 μM sodyum tetra borat uygulanan konsantrasyonda, mitokondrilerin şekillerinde ovalden yuvarlağa dönüşümler gözlenmiştir, kristalların düzenindeki bozulmalar bir miktar daha artmıştır. 1000 μM sodyum tetra borat uygulanan lenfositlerde mitokondriler tamamen şekillerini yitirmiş, kristaları parçalanmıştır. Endoplazmik retikulum zar bütünlüğünü kaybetmiş, birbirinden bağımsız parçacıklar şeklinde stoplazmaya dağılmışlardır(Fotoğraf 2).



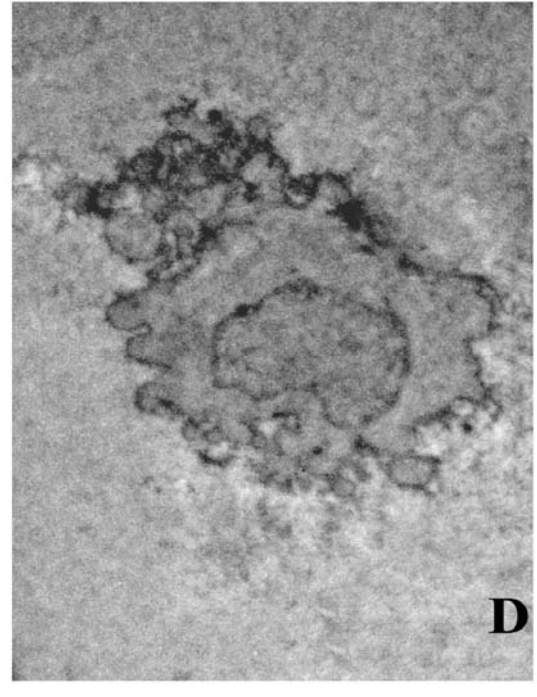
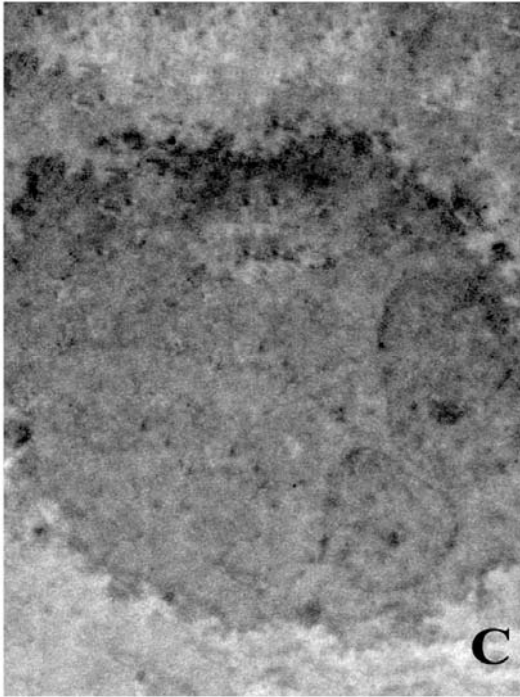
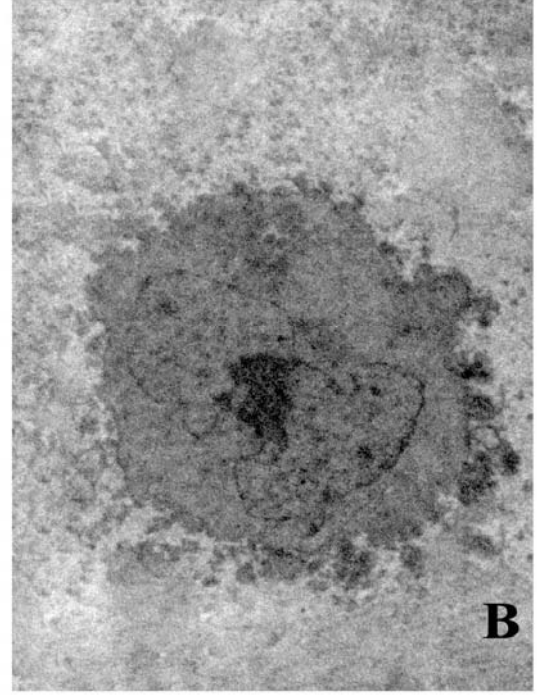
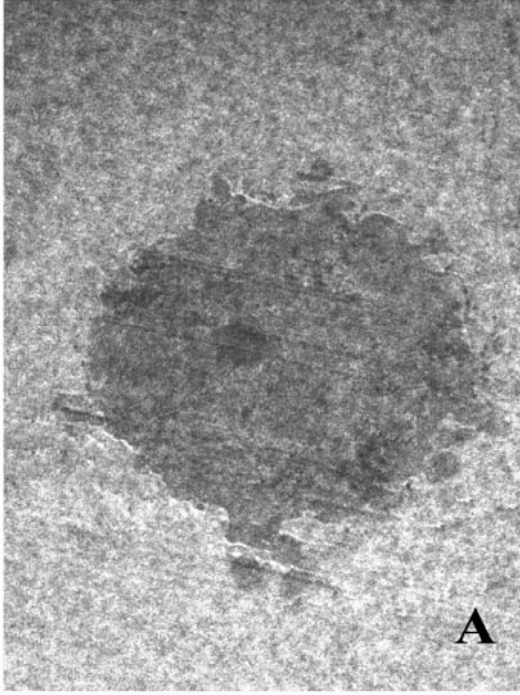
Fotoğraf 1: Sağlıklı lenfositlere borik asit uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi. A-Kontrol grubu (x2550), B-250 µM borik asit konsantrasyonu (x6000), C-500 µM borik asit konsantrasyonu (x2550), D-1000 µM borik asit konsantrasyonu (x2550)



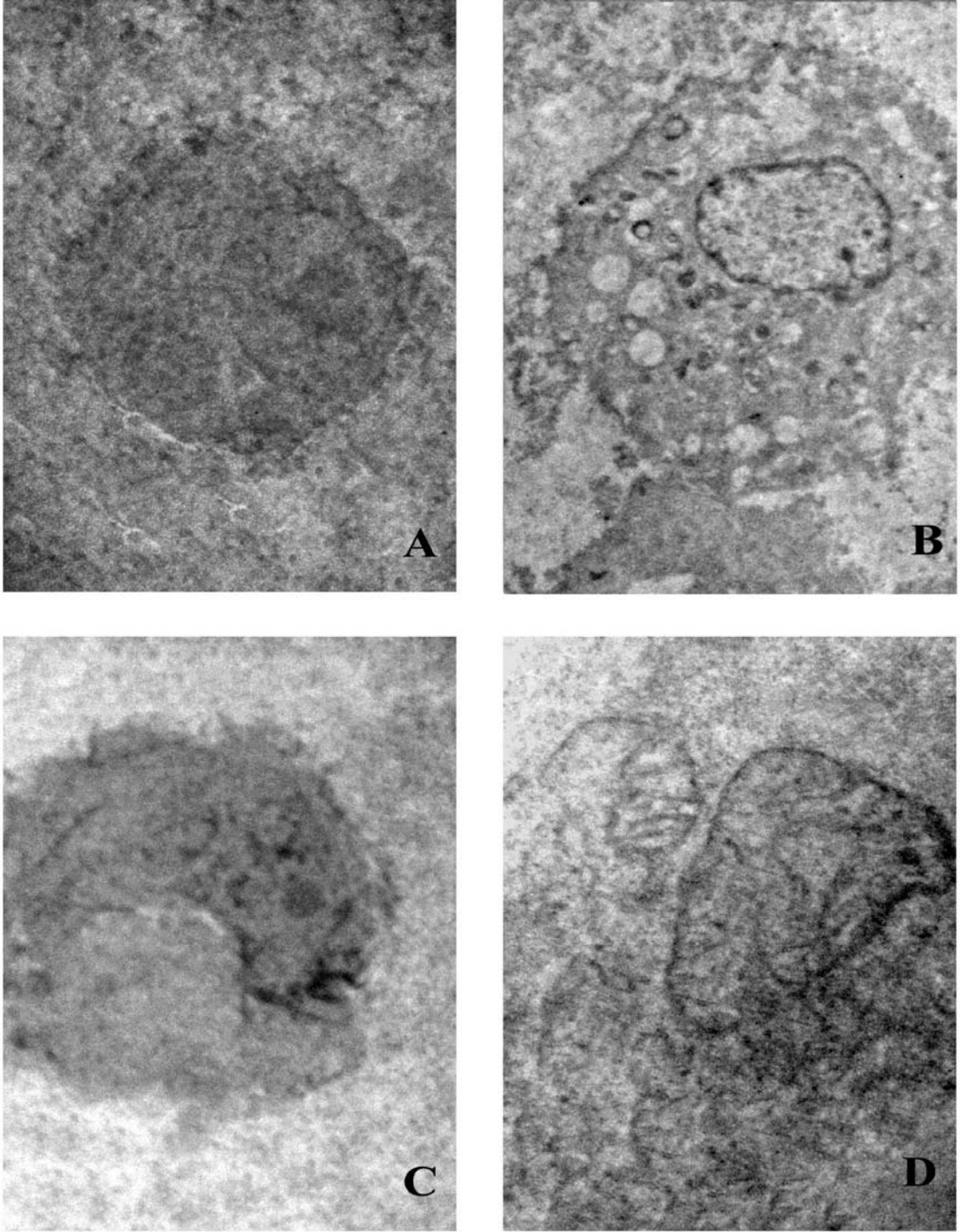
Fotoğraf 2: Sağlıklı lenfositlere sodyum tetra borat uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi. A-Kontrol grubu (x2550), B-250 µM sodyum tetra borat konsantrasyonu (x6000), C-500 µM sodyum tetra borat konsantrasyonu (x6000), D-1000 µM sodyum tetra borat konsantrasyonu (x6000)

Borik asit HL-60 hücreleri üzerine uygulandığında geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile elde edilen bulgular şöyledir; kontrol grubundaki hücrelerin plazma ve çekirdek zar bütünlüğü bozulmamıştır. Spesifik morfolojik yapısını korumuştur. 100 μM uygulanan borik asit konsantrasyonunda görülen değişiklikler kontrol grubundan farklı olmadığı için görüntüleri yer almamaktadır. 250 μM borik asit e maruz kalan HL-60 hücrelerinde çekirdek bölünmesinin başlangıç evresinde hücre görüntülenmiştir. Genetik materyal ortada toplanmış ve ikiye bölünmek için hücrede hazırlık başlamıştır. 500 μM borik asit uygulanan HL-60 hücrelerinde çift nukleus oluşumu gözlemlendi ve mikronukleuslara rastlandı. 1000 μM olan borik asit konsantrasyonda ise hücre çekirdeği spesifik şeklini yitirmiş, hücre zarının yapısının tamamen bozulmuş, stoplazmadaki organeller yapısını kaybetmiştir. Apoptotik cisimciklerin sayısı hücre zarının etrafında artmıştır. Hücre zarındaki apoptotik cisimcikler ve baloncuklar artmıştır (Fotoğraf 2). Kontrol grubunda en yüksek dozda apoptotik baloncuklar oluşmaya başlamış ancak HL-60 hücreleri gibi zar bütünlüğü tamamen bozulmamıştır. Genetik materyal bir kenara itilmiş olarak görüntülendi ancak HL-60 hücrelerinde genetik materyal görüntülenmedi. Hücre sadece zar yapısında görüntülenebildi (Fotoğraf 3).

Sodyum tetra borat uygulanan HL-60 hücrelerinin geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile elde edilen bulgular şöyledir; kontrol grubunda hücrelerin plazma ve çekirdek zar bütünlüğü korunmuştur. 100 μM sodyum tetra borat uygulanan hücrelerde genel hücre görünümünden çok farklı bir görüntü izlenemediği için bu doz görüntü olarak yer almamaktadır. 250 μM sodyum tetra borat uygulanan hücrelerde sitoplazmada vakuoller oluşmuş, genetik materyal çekirdek zarının belli kısımlarında yoğunlaşmıştır. Hücre zarı spesifik yapısını yitirmiş ve zar yüzeyindeki uzantılar kaybolmuş ve hücre zarı büzülmeye başlamıştır. 500 μM uygulanan konsantrasyonda hücre çekirdeğinde bulunan genetik materyal bir köşeye itilip çekirdek yuvarlak olan şeklini kaybetmeye başlamış ve hücre çekirdeği yarım ay şeklinde görüntülendi. 1000 μM sodyum tetra borat uygulanan hücrelerin mitokondilerin kristalleri tamamen parçalanmış, dev mitokondriler gözlemlendi. Endoplazmik retikulum bütünlüğünü kaybetmiştir ve yer yer parçalanmıştır (Fotoğraf 4).



Fotoğraf 3: HL-60 hücrelerine borik asit uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi. A-Kontrol grubu (x2550), B-250 µM borik asit konsantrasyonu (x2550), C-500 µM borik asit konsantrasyonu (x2550), D-1000 µM borik asit konsantrasyonu (x2550)



Fotoğraf 4: HL-60 hücrelerine sodyum tetra borat uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi. A-Kontrol grubu (x2550), B-250 µM sodyum tetra borat konsantrasyonu (x2550), C-500 µM sodyum tetra borat konsantrasyonu (x2550), D-1000 µM sodyum tetra borat s konsantrasyonu (x6000)

9. TARTIŞMA

Çalışmamızda sağlıklı insan lenfositleri ve akut lösemi hücreleri üzerinde (HL-60) borik asit ve sodyum tetra borat bileşiklerinin etkilerini araştırıldı. Bunun için sitotoksosite testlerinden mitokondriyal aktiviteyi ölçmek için MTT yöntemini, lizozomal aktiviteyi ölçmek için Neutral Red boyasını, apoptozu değerlendirmek için akım sitometride akridin oranj boyasını, ince yapı değişikliklerini tespit edebilmek için geçirimli elektron mikroskobunu kullanıldı.

Borik asiti sağlıklı insan lenfositleri üzerine uygulayıp MTT yöntemi ile değerlendirdiğimizde hücrelerin MTT absorbans değerlerini şöyle bulduk; 3. günde kontrol grubunu değeri 0,34, 100 µM olan konsantrasyon 0,23, 250 µM olan konsantrasyon 0,24, 500 µM olan konsantrasyon 0,25, 1000 µM olan konsantrasyon 0,25'dir. 4.günde ise kontrol grubunu değeri 0,19, 100 µM olan konsantrasyon 0,12, 250 µM olan konsantrasyon 0,12, 500 µM olan konsantrasyon 0,11, 1000 µM olan konsantrasyon 0,11'dir. (Şekil 1). Sağlıklı lenfositlerde borik asit olan kuyucuklarda konsantrasyona bağlı olarak mitokondriyal aktivitede azalma saptanmıştır. Esas etki 250 µM olan konsantrasyonda başlamıştır. 3. ve 4. günlerde MTT test değerlerinin azalması kontrolde de olduğu için kültür şartlarına (medium, hücre toksinleri) bağlanmıştır. Yine doza bağlı olarak bu günlerde MTT absorbansında azalma vardır. Borik asit'in insan lenfositleri üzerine mitokondriyal aktiviteyi ve proliferasyonu azaltıcı etkisi olduğu düşünülmüştür. Normal lenfositler üzerine borik asit etkisini gösteren literatür çalışması olmadığından kıyaslama yapılamamıştır.

Sodyum tetra boratın sağlıklı insan lenfositleri üzerine uygulayıp MTT yöntemi ile değerlendirdiğimizde hücrelerin MTT absorbans değerlerini şöyle bulduk; 1.gün kontrol grubunu değeri 0,42, 100 µM olan konsantrasyon 0,40, 250 µM olan konsantrasyon 0,40, 500 µM olan konsantrasyon 0,34, 1000 µM olan konsantrasyon 0,32'dir. 2.günde kontrol grubunu değeri 0,46, 100 µM olan konsantrasyon 0,45, 250 µM olan konsantrasyon 0,41, 500 µM olan konsantrasyon 0,41, 1000 µM olan konsantrasyon 0,43' dür. Sodyum tetra

boratta 1.günde 500 µM konsantrasyonda 2. günde 250, 500, 1000 µM olan dozda anti-proliferatif etki görülmüştür. Sodyum tetra borat'ın insan lenfositleri üzerinde görülen etkisinin 1.günde özellikle 500 ve 1000 µM konsantrasyonda gösterdiği (Şekil 2). 2., 3. ve 4. günlerde doza bağlı toksik etki bakımından aralarında fark görülmemiştir. Sodyum tetra borat'ta görülen 3. ve 4. günlerdeki MTT absorbansındaki azalma kültür şartlarına bağlanmıştır (medium ve hücre toksinleri). Kontrole göre belirgin olarak sodyum tetra borat'ın lenfositleri inhibe ettiği görülmüştür. Sodyum tetra borat'ın insan lenfositleri üzerine etkisini gösteren literatür olmadığından kıyaslama yapılamamıştır. Ancak bulgularımıza göre sodyum tetra borat'ın' insan lenfositlerinin proliferasyonunu engelleyici ve mitokondriyal aktiviteyi azaltıcı etkisi vardır.

Borik asiti HL-60 hücreleri üzerine uygulayıp MTT yöntemi ile değerlendirdiğimizde canlı hücrelerin mitokondrilerinin absorbans değerlerini şöyle bulduk; 3.günde kontrol grubunu değeri 0,53, 100 µM olan konsantrasyon 0,34, 250 µM olan konsantrasyon 0,32, 500 µM olan konsantrasyon 0,25, 1000 µM olan konsantrasyon 0,22'dir. 4.günde ise kontrol grubunu değeri 0,48, 10 0µM olan konsantrasyon 0,36, 250 µM olan konsantrasyon 0,36, 500 µM olan konsantrasyon 0,38, 1000 µM olan konsantrasyon 0,34'tür (Şekil 3). Elde ettiğimiz bulgulara göre borik asit esas etkisini 3.günde ortaya çıkarmaktadır. 3. günde 500 ve 1000 µM olan konsantrasyonlardaki etki 100 ve 250 µM olan konsantrasyona göre daha fazla olmaktadır. Bu sonuçlara göre borik asit HL-60 hücre serisi üzerine proliferasyonu engelleyici ve mitokondriyal aktiviteyi azaltıcı etkiye sahiptir ve bu doz ile ilişkilidir. 4. günde ise proliferatif etki azalmaktadır. Bu konuda prostat kanseri hücre serisi üzerinde yapılan çalışmada borik asit'in DU-145 hücre serisi üzerinde 100, 250, 500 ve 1000 µM olan konsantrasyonlarda doza bağlı olarak MTT absorbansında azalma gösterdiği bulunmuştur(44).

Sodyum tetra boratı HL-60 hücreleri üzerine uygulayıp MTT yöntemi ile değerlendirdiğimizde canlı hücrelerin mitokondrilerinin absorbans değerlerini şöyle bulduk; 2. günde kontrol grubunu değeri 0,41, 100 M olan 29'dur. 3.günde kontrol grubunu değeri 0,43, 100 µM olan konsantrasyon 0,36, 250 µM olan konsantrasyon 0,32, 250 µM olan konsantrasyon 0,32, 500 µM olan konsantrasyon 0,34, 1000 µM olan

konsantrasyon 0,33, 500 μM olan konsantrasyon 0,24, 1000 μM olan konsantrasyon 0,23'dir. 4.günde ise kontrol grubunu değeri 0,46, 100 μM olan konsantrasyon 0,43, 250 μM olan konsantrasyon 0,41, 500 μM olan konsantrasyon 0,41, 1000 μM olan konsantrasyon 0,33'tür. Sodyum tetra borat'ın 1. günde etkisi 1000 μM olan konsantrasyonda başlamıştır. Esas etkisi 2. günde konsantrasyona bağlı olarak bir azalma görölmüştür en fazlada 1000 μM olan konsantrasyonda görölmüştür. 3. günde konsantrasyona bağlı azalma görölmüştür. 4. günde bu etki azalmaktadır. Bu bulgulara göre sodyum tetra borat'ta borik asit gibi HL-60 lösemi hücrelerinde proliferasyonu ve mitokondriyal aktiviteyi azaltmaktadır. Literatürde bu konuyla ilgili çalışma olmadığından kıyaslama yapılamamıştır.(Şekil 4).

Borik Asiti sağlıklı insan lenfositleri üzerine uygulayıp Neutral Red yöntemi ile değerlendirdiğimizde canlı hücrelerin lizozomal aktivite absorbans değerlerini şöyle bulduk; 3. günde kontrol grubunu değeri 1,23, 100 μM olan konsantrasyon 1,34, 250 μM olan konsantrasyon 1,42, 500 μM olan konsantrasyon 1,22, 1000 μM olan konsantrasyon 1,11'dir. 4.günde ise kontrol grubunu değeri 1,74, 100 μM olan konsantrasyon 1,71, 250 μM olan konsantrasyon 1,65, 500 μM olan konsantrasyon 1,56, 1000 μM olan konsantrasyon 1,44'tür. Borik asit sağlıklı insan lenfositlerinde sadece 3. günde etkili olduğu gözlemlenmiştir. 4. gün bu etki ortadan kalkmaktadır. Bu bulgulara göre borik asitin sağlıklı insan lenfositleri lizozomları üzerine çok sınırlı etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 5).

Borik Asiti HL-60 hücreleri üzerine uygulayıp Neutral Red yöntemi ile değerlendirdiğimizde canlı hücrelerin lizozomal aktivite absorbans değerlerini şöyle bulduk; 2. günde kontrol grubunu değeri 1,44, 100 μM olan konsantrasyon 1,51, 250 μM olan konsantrasyon 1,52, 500 μM olan konsantrasyon 1,52, 1000 μM olan konsantrasyon 1,34'dür. 3.günde kontrol grubunu değeri 1,43, 100 μM olan konsantrasyon 1,44, 250 μM olan konsantrasyon 1,43, 500 μM olan konsantrasyon 1,45, 1000 μM olan konsantrasyon 1,42'dir. 4.günde ise kontrol grubunu değeri 1,44, 100 μM olan konsantrasyon 1,43, 250 μM olan konsantrasyon 1,42, 500 μM olan konsantrasyon 1,42, 1000 μM olan konsantrasyon 1,42'tür. Borik asit'in HL-60 hücrelerinde özellikle 2. günde lizozomal

aktivitede artışa neden olmuştur. Diğer günlerde önemli bir fark görülmemiştir. Borik asit ile Neutral Red yöntemi kullanılarak lizozomal aktivite açısından lösemi hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim elde ettiğimiz bulgular borik asitin HL-60 hücre serisi üzerine 48. saatte lizozomal aktiviteyi azaltarak etkilediğini göstermiştir (Şekil 6).

Sodyum tetra boratın sağlıklı insan lenfositleri üzerine uygulayıp Neutral Red yöntemi ile değerlendirdiğimizde canlı hücrelerin lizozomal aktivite absorbans değerlerini şöyle bulduk; 2.günde kontrol grubunu değeri 1,44, 100 μM olan konsantrasyon 1,49, 250 μM olan konsantrasyon 1,36, 500 μM olan konsantrasyon 1,45, 1000 μM olan konsantrasyon 1,43' dür. 4.günde ise kontrol grubunu değeri 1,64, 100 μM olan konsantrasyon 1,64, 250 μM olan konsantrasyon 1,57, 500 μM olan konsantrasyon 1,53, 1000 μM olan konsantrasyon 1,64'tür. Sodyum tetra borat 2. ve 4. günde lizozomal aktivitede azalmaya neden olmuştur(Şekil 7). Verilerimize göre sodyum tetra borat normal insan lenfositlerinde lizozomal aktiviteyi azaltmaktadır.

Sodyum tetra boratı HL-60 hücreleri üzerine uygulayıp Neutral Red yöntemi ile değerlendirdiğimizde canlı hücrelerin lizozomal aktivite absorbans değerlerini şöyle bulduk; 2.günde kontrol grubunu değeri 1,44, 100 μM olan konsantrasyon 1,41, 250 μM olan konsantrasyon 1,36, 500 μM olan konsantrasyon 1,34, 1000 μM olan konsantrasyon 1,32'dir. 3.günde kontrol grubunu değeri 1,45, 100 μM olan konsantrasyon 1,16, 250 μM olan konsantrasyon 1,23, 500 μM olan konsantrasyon 1,17, 1000 μM olan konsantrasyon 1,30'dur. 4.günde ise kontrol grubunu değeri 1,45, 100 μM olan konsantrasyon 1,35, 250 μM olan konsantrasyon 1,36, 500 μM olan konsantrasyon 1,27, 1000 μM olan doz 1,11'dir. Sodyum tetra borat HL-60 hücreleri üzerinde 2., 3., ve 4. günlerde anlamlı bir azalma görülmüştür. (Şekil 8). Bu bulgulara göre borik asit lizozomal aktiviteyi arttırmış sodyum tetra borat ise azaltmıştır. Sodyum tetra borat ile Neutral Red yöntemi kullanılarak lizozomal aktivite açısından lösemi hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu farklılığın nedeni hücre içindeki organellere bağlanma, etkilediği sistemlerin yapısı, yapısına girdikleri nükleotit, enzimler ve proteinlerin farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

Borik asiti sağlıklı lenfositler üzerinde akridin oranj boyası kullanılarak akış hücremetrede değerlendirildiğinde; kontrol olarak kullandığımız sağlıklı lenfositlere borik asit uyguladığımızda 1000 µM olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %85,9; yüzde apoptotik oran % 2,5 olarak bulduk(Şekil 9). Borik asit'in 1000 µM olan konsantrasyonunun normal lenfositlere olan etkisi % 2,5 iken lösemi hücrelerinde bu yüzdenin %8,8 'e ulaştığı gözlemlenmiştir. Bulgularımıza göre borik asit'in normal lenfositler üzerine sınırlı etkisi bulunmaktadır.

Sodyum tetra boratı (boraks) sağlıklı lenfositlere uyguladığımızda akridin oranj boyasıyla akış hücremetrede; 1000 µM olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %94,08; yüzde apoptotik oranı % 3,1 olarak bulduk(Şekil 10). Sodyum tetra borat'ın lenfositlerdeki yüzde apoptotik oranı en yüksek dozda % 3,1 iken HL-60 hücrelerinde bu oran % 4.9'a çıkmaktadır. Sodyum tetra borat'ta borik asit kadar olmasa da lösemi hücrelerine lenfositlere göre daha fazla etkilidir.

Borik asiti HL-60 hücrelerine uyguladığımızda akridin oranj boyasıyla akış hücremetrede; 1000 µM olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %78,4; yüzde apoptotik oran % 8,8 olarak bulduk (Şekil 11). Borik asit'in 1000 µM olan konsantrasyonunun normal lenfositlere olan etkisi % 2,5 iken lösemi hücrelerinde bu yüzdenin %8.8 'e ulaştığı gözlemlendi. Bu da bize borik asit'in normal lenfositlere göre lösemi hücrelerinde daha fazla apoptotik etki gösterdiğini ve etkinliği için daha geniş sayıda hasta içeren çalışmalarla etkinliği açıklığa kavuşturulmalı düşünceini oluşturdu.

Sodyum tetra boratı(boraks) akut lösemi hücrelerine uyguladığımızda akridin oranj boyasıyla akış sitometride, 1000 µM olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesini %85,3; yüzde apoptotik oran % 4,9 olarak bulduk (Şekil 12). Sodyum tetra borat, borik asit kadar olmasa da lösemi hücrelerinde sağlıklı lenfositlere kıyasla daha etkilidir.

Çalışmalarımızda kullandığımız elektron mikroskobu 120 bin kilovat elektrik gücüne ve 300 bin kez büyütme gücüne sahiptir. Bu nedenle kullandığımız bor

bileşiklerinin hücrelerin organellerini nasıl etkilediğinin araştırılması bakımından büyük bir öneme sahiptir. Geçirimli elektron mikroskobu türlerinden özellikle biyolojik numuneler için tasarlanmıştır (Philips Bio-Twin G2 Spirit) Sağlıklı lenfositlere borik asit uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile elde edilen bulgular şöyledir; 100 μM uygulanan dozda kontrol grubuyla aynı görüntüler elde edilmiştir. Kontrol grubunda genetik materyal perinuklear alanda homojen bir şekilde dağılmıştır. Savunmada ve salgılamada görevli sitoplazmik uzantılar spesifik şekliyle görüntülenebilmiştir. 250 μM borik asit' e maruz kalan grup da sekonder lizozom oluşumları ortaya çıkmış,mitokondriler şekillerini yitirmeye başlamıştır. 500 μM borik asit uygulanan lenfosit grubunda mikronükleus oluşumlar gözlenmiş, hücre çekirdeği spesifik şeklini yitirmiştir. 1000 μM borik aside maruz kalan lenfositlerde ise hücre zarı etrafında apoptotik cisimcikler oluşmuştur. Ve hücre çekirdeği tamamen kenara itilmiş, organeller tam olarak görüntülenememiştir (Fotoğraf 1). Görüntülere göre 500 μM 'dan sonra borik asit sağlıklı insan lenfositlerine zarar veriyor diyebiliriz. Hücre organellerinde en çok mitokondrilerin zarar gördüğü görüntülenmiştir.

Sağlıklı lenfositlere sodyum tetra borat uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile elde edilen bulgular şöyledir; 500 μM boraks uygulanan konsantrasyonda, mitokondrilerin şekillerinde ovalden yuvarlağa dönüşümler gözlenmiştir, kristaların düzenindeki bozulmalar bir miktar daha artmıştır. 1000 μM boraks uygulanan lenfositlerde mitokondriler tamamen şekillerini yitirmiş, kristaları parçalanmıştır. Endoplazmik retikulum zar bütünlüğünü kaybetmiş, birbirinden bağımsız parçacıklar şeklinde stoplazmaya dağılmışlardır. Sağlıklı lenfositlere sodyum tetra borat uygulandığında 500 μM konsantrasyondan sonra mitokondrilerde bozulmalar saptanmıştır, mitokondrilerin kristaları parçalanmaya başlamıştır. Dolayısıyla bor bileşikleri 500 μM olan konsantrasyonda lenfositlere toksik etki gösteriyor diyebiliriz(Fotoğraf 2). Çünkü hem borik asit'te hem de sodyum tetra boratta 1000 μM 'da hücrede apoptotik cisimcikler saptanmıştır, bu dozda normal lenfositlerde HL-60 hücrelerindeki kadar toksik etki gözlenmemiştir. Elektron mikroskobu görüntüsüne göre konsantrasyon arttıkça normal hücrelere göre lösemi hücrelerinde daha patolojik değişiklikler ortaya çıkmaktadır.

Borik asit HL-60 hücreleri üzerine uygulandığında geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile elde edilen bulgular şöyledir; kontrol grubundaki hücrelerin plazma ve çekirdek zar bütünlüğü bozulmamıştır. Spesifik morfolojik yapısını korumuştur. 500 μ M borik asit uygulanan HL-60 hücrelerinde çift nukleus oluşumu gözlenmiş ve mikronukleuslara rastlanmıştır. 1000 μ M olan borik asit konsantrasyonda ise hücre çekirdeği spesifik şeklini yitirmiş, hücre zarının yapısının tamamen bozulmuş, stoplazmadaki organeller yapısını kaybetmiştir ve gözlemlenememektedir. Apoptotik cisimciklerin sayısı hücre zarının etrafında artmıştır. Hücre zarındaki apoptotik cisimcikler ve baloncuklar artmıştır(Fotoğraf 3) Kontrol olarak kullandığımız sağlıklı insan lenfositlerinde ve akut lösemi hücrelerinde 500 μ M aynı bulguların saptanması bu bileşiklerin 500 μ M dan sonra hücre tarafından toksik etkisinin daha fazla hissedildiği ve hücreyi apoptozise götürürken de hücre tarafından bir ölüm sinyali olarak algılandığını göstermektedir.

Sodyum tetra borat uygulanan HL-60 hücrelerinin geçirimli elektron mikroskobu(TEM) ile elde edilen bulgular şöyledir; kontrol grubunda hücrelerin plazma ve çekirdek zar bütünlüğü korunmuştur. 500 μ M uygulanan dozda hücre çekirdeğinde bulunan genetik materyal bir köşeye itilip çekirdek yuvarlak olan şeklini kaybetmeye başlamış ve hücre çekirdeği yarım ay şeklinde görüntülenmiştir. 1000 μ M boraks uygulanan hücrelerin mitokondilerin kristalleri tamamen parçalanmış, dev mitokondriler gözlemlenmiştir. Endoplazmik retikulum bütünlüğünü kaybetmiştir ve yer yer parçalanmış olduğunu bulduk.(Fotoğraf 4). Sodyum tetra borat akut lösemi hücrelerine uygulandığında borik asit kadar hücre morfolojisinde çok büyük değişikliklere rastlanmamıştır. En yüksek doz olan 1000 μ M mitokondrileri etkilemiş dev mitokondri oluşumları gözlemlenmiş ve mitokondrilerin kristallarının parçalandığı elektron mikroskobunda görüntülenmiştir.

Hem mikronukleus oluşumları hemde çift nukleus oluşumları lösemi hücreleri için özellikle borik asit'in sonrası toksik etkili olduğu görülmüştür. Kullandığımız bor bileşiklerinden özellikle borik asit'in hücreyi apoptozise götürürken mitokondriyal yolu etkilediği düşünülmektedir ve geçirimli elektron mikroskobunun kanser hücreleri üzerindeki ilaç niteliğinde kullanabilecek toksik maddelerin etkilerini araştırmada ve

konsantrasyona bağlı olarak hücrenin apoptozise gitmesinin görüntülenmesinde iyi bir araç olduğu düşünölmektedir.

Bor bileşiklerinin proteozom inhibitörü olarak çalıştığı düşünölmektedir. Proteozomlar multikatalitik enzimkompleksidirler. Nukleus ve stoplazmadan eksprese edilirler. 19S ubiquitini olan proteinleri tanırlar. Ubiquitin bağlanarak yıkım için hedeflenmiş proteinleri sindiren çoklu proteaz enzimleridir. Ubiquitin ise tüm hücrelerde bulunan, evrim sırasında çok iyi korunmuş (bakterilerden insana kadar) hemen hemen aynı yapıya sahip 76 aminoasitli bir proteindir. Ubiquitin molekülü, ayrıştırılacak proteinde lizin kalıntısına bağlanır. Sonra diğer ubiquitin molekülleri birinciye bağlanır, bileşik düzenleyici parçacık tarafından tanınır; protein kıvrımı ATP'den enerji kullanarak ATPaz tarafından açılır; protein merkezi parçacığın içine taşınarak yerleştirilir ve burada her birinde yaklaşık 8 aminoasit bulunan peptitlere parçalanır. Bu peptitler henüz bilinmeyen bir şekilde sitozole taşınır. Ubiquitin ise yeniden kullanılmak üzere düzenleyici parçacık tarafından serbest bırakılır. Bor bileşiklerinin de ubiquitine bağlanarak kanserli hücreleri yok ettiği düşünölmektedir.

10. SONUÇLAR

1) Borik asitin sağlıklı lenfositler üzerinde MTT yöntemine göre en yüksek konsantrasyon olan 1000 μM 'da % 20'lik mitokondriyal aktivitede bir azalma yaptığı görülmüştür. İstatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde fark bulunmuştur.

2) Sodyum tetra borat ise MTT yöntemine göre 1. günde % 25'lik mitokondriyal aktivitede bir azalma yaptığı görülmüştür, ancak diğer günlerde ve konsantrasyonlarda aynı azalma görülmemiştir. 2. günün 100 μM olan konsantrasyonda, 3. ve 4. günlerin 1000 μM olan konsantrasyonları arasında kontrole göre bir fark bulunmamıştır. 1. ve 2. günde kontrol ve konsantrasyonlar arasında istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde fark bulunmuştur. 3. ve 4. günlerin 1000 μM olan konsantrasyonda anlamlı bir fark bulunmamıştır.

3) Borik asit HL-60 (lösemi) hücreleri üzerinde MTT yöntemine göre değerlendirildiğinde mitokondriyal aktivitede % 50'lik bir azalma görülmüştür. 1. günde 500 μM ve 1000 μM olan konsantrasyonlarda anlamlılık bulunmamıştır. 2., 3., ve 4. günlerde tüm konsantrasyon da istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde fark bulunmuştur.

4) Sodyum tetra boratta ise MTT yöntemine göre lösemi hücrelerinde en fazla % 20'lik bir azalma görülmüştür. 1.günde 1000 μM olan konsantrasyonda $p \leq 0,05^*$ önemli derecede fark bulunmuştur. Diğer konsantrasyonlarda anlamlı fark bulunmamıştır. 2. ve 3. günde istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde fark bulunmuştur. 4. günde ise 100 μM olan konsantrasyonda $p \leq 0,05^*$ önemli derecede fark bulunmuştur. 2., 3. ve 4. günlerde ise istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde fark bulunmuştur.

5) Borik asit, Neutral Red yöntemine göre sağlıklı lenfositler üzerinde 1. günde konsantrasyon artışına bağlı olarak lizozomal aktivitede bir azalma göstermiştir. Diğer

günler ve konsantrasyonlar arasında çok büyük farklar görülmemiştir. 1., 2. ve 4. günlerin 100 µM olan konsantrasyonlarında anlamlı fark bulunmamıştır. Diğer konsantrasyonlar ve günler arasında istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde fark bulunmuştur.

6) Sodyum tetra boratın, Neutral Red yöntemine göre sağlıklı lenfositler üzerinde 1., 2., 3., ve 4. günde kontrol ve konsantrasyonlar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

7) Borik asitin Neutral Red yöntemine göre HL-60 hücreleri üzerinde 2.günde 100, 250, 500µM olan konsantrasyonda lizozomal aktivitede artış görülmüştür.3.günde ve 4.günde konsantrasyonlar arasında fark görülmemektedir. 2, günde kontrol ve konsantrasyonlar arasında istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde fark bulunmuştur.

8) Sodyum tetra boratın, Neutral Red yöntemine göre HL-60 hücreleri üzerinde 1. günde ve 2. günde konsantrasyona bağlı olarak lizozomal aktivitesinde % 4'lük bir azalma saptanmıştır. 4.günde ise kontrol ile karşılaştırıldığında lizozomal aktivitede % 30'luk bir azalma görülmüştür. Kontrol ve konsantrasyonlar arasında istatistiksel açıdan $p \leq 0,001^{***}$ ileri düzeyde fark bulunmuştur.

9) Borik asitin sağlıklı lenfositler üzerinde akridin oranj boyası kullanılarak akış hücremetrede apoptotik etkisine bakıldığında en yüksek konsantrasyonda % 2,5 olduğu bulunmuştur.

10) Sodyum tetra boratın sağlıklı lenfositler üzerinde akridin oranj boyası kullanılarak akış hücremetrede apoptotik etkisine bakıldığında en yüksek konsantrasyon da % 3,1 olduğu bulunmuştur.

11)) Borik asitin HL-60 hücreleri üzerinde akridin oranj boyası kullanılarak akış hücremetrede apoptotik etkisine bakıldığında en yüksek konsantrasyonda % 8.8 olduğu bulunmuştur.

12) Sodyum tetra boratın HL-60 hücreleri üzerinde akridin oranj boyası kullanılarak akış hücremetrede apoptotik etkisine bakıldığında en yüksek konsantrasyonda % 4,9 olduğu bulunmuştur.

13) Borik asitin ve sağlıklı lenfositlere ve lösemi hücreleri üzerine uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu (TEM) sonuçlarına göre; borik asit'in 500 μ M konsantrasyonundan sonra borik asit sağlıklı insan lenfositlerinde ve lösemi hücrelerinde mikronukleus ve çift nukleus oluşumlarına yol açtığı görüntülenmiştir. 1000 μ M olan konsantrasyonda lösemi hücrelerine normal lenfositlere göre daha belirgin toksik etki oluşturmuştur.

14) Sodyum tetra borat'ın sağlıklı lenfositler ve lösemi hücrelerine uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu (TEM) sonuçlarına göre, 500 μ M'dan sonra hücre organellerinden en çok mitokondrilerin zarar gördüğü endoplazmik retikulumunda bütünlüğünü kaybettiğini söyleyebiliriz. Bu etki lösemi hücrelerinde sağlıklı lenfositlere göre daha aşikar bulunmuştur.

11. ÖNERİLER

Yaptığımız çalışma bor bileşiklerinin HL-60 lösemi hücre tipi üzerine etkili olduğunu göstermiştir. Bu konuda lösemi hücre soyları ve lösemik hastaların hücrelerinde daha çok sayıda hastayla yapılacak çalışmalar gerekmektedir. Bunun sonucuna göre bor bileşiklerinin lösemi tedavisinde rolü açıklığa kavuşacaktır.

12. KAYNAKLAR DİZİNİ

- 1) Abbas, K., Andrew, H., 1991, Cellular and Molecular Immunology, 10, 233-239 p.
- 2) Andreeff M., Darzynkiewicz Z, Sharpless TK, Clarkson BD, Melamed MR., 1980, Discrimination of human leukemia subtypes by flow cytometry analysis of cellular DNA and RNA, Blood. 1980 Feb; 55(2): 282-93p.
- 3) Arends, M.J., Wyllie, A.H., 1991, Apoptosis: mechanisms and roles in pathology, International Reviews Experimental Pathology , 32,223 p.
- 4) Barile, F.A.,2001, Continuous cell lines as a model for drug toxicity assessment,Atla., Part IV 32-43 p.
- 5) Barret, J.M., Ernould, A.P., Ferry, G., Genton, A., Boutin, J.A., 1993, Integrated system for the screening of the specificity of protein kinase inhibitors.Biochemical Pharmacology, 46,439-448 p.
- 6) Bozola, J.J., Russel, L.D.,1999, Electron Microscopy, 18–38 p.
- 7) Celis, J.E., 1998, Cell Biology. A Laboratory Handbook, San Diego, Academic Press Vol 1, 264-267, 453s., Vol 3, 17 p.
- 8) Chapin, R.E., Ku W.W.,1994, The Productive toxicity of Boric Acid; Environmental Health Persp, 102, 87-91p.
- 9) Cohen, J.,1993, J.Apoptosis Immunol Today, 14, 126-130 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- 10)** Curtis, J.E., Minkin, S., Minden, M.D., Mcculloch, E.A., 1996, A role for paclitaxel in the combinatin chemotherapy af acute myeloblastic leukaemia: preclinal cell culture studies, *British Journal of Haematology*, 95, 354-363 p.
- 11)** Das, G.C., Holiday, D., Gallardo, R., Haas, C., 2001, Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose-response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic condition. *Cancer Letters* 165, 147–153 p.
- 12)** Denizot, F., Lang, R., 1986, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *Journal of Immunological Methods*, 89, 271-77 p.
- 13)** Dibas, A.,Howard, J., Anwar, S., Stewart, D., Khan, A., 2000, Borato-1,2 diaminocylohexane Platinum (II),a Novel Anti-Tumor Drug . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270, 383–386 p.
- 14)** Duffy, M.J., Magurie, T.M., Hill, A., Mcdermott, E., O'higgins, N.,2000, Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis, *Breast Cancer Research*, 2, 252–257 p.
- 15)** Duke, R.C., Gamne, S. ,Hanson, D.A,1998, Granulysin-induced apoptosis Involvement of at least two distinct pathways, *J Immunol*, 161, 1758–1764 p.
- 16)** Duwall, E., Wyllie, A.H.,1986, Death and the cell. *Immunology Today*, 7, 115, p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- 17)** Fenton, R.G., Longo, D.L.,1998, Cell Biology of cancer. Harrison's Principle of Internal Medicine. 14. Edition, CD-ROM, McGraw-Hill ,205-210 p.
- 18)** Franks, L.M., 1997, What is cancer? Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Editör: Franks, L.M. Teich, N.M., Oxford University Press, Oxford , 1-19 p.
- 19)** Freshney, I., 1994, Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques. John Wiley & Sons Inc. Publication. New York. , 45-195 p.
- 20)** Fogh, J., 1998, Human tumor cells in vitro, , Plenum Press, New York, 115–159 p.
- 21)** Fukuda, K., Hibiya, Y., Muto, M., Koshiji, M., Akao, S., Fujiwara, H.,1999, Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells, Journal of Ethnopharmacology, 66, 227-33 p.
- 22)** Gao, S., Scott, R.E., 2002, P2P-R protein overexpression restricts mitotic regression at prometaphase and promotes mitotic apoptosis, Journal of Cell Physiology, 193,199–207p.
- 23)** Gazdar, J.D., Mitchell, J.B.,1987, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Research ,47, 936–942, p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- 24)** Gillies, R.J., Didier, N., Denton, M., 1986, Determination of cell number in monolayer cultures, *Analytical Biochemistry* ,159,109–13 p.
- 25)** Gomez-Lechon, J.V., 1997, *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, London, Academic Pres.84-86 p.
- 26)** Hardy, K., Stark, J.,2002, Mathematical models of the balance between apoptosis and proliferation *Apoptosis* 7, 373–381 p.
- 27)** Hart, I.R.,1998, The spread of tumours. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Editör: Franks, L.M., Teich, N.M., Oxford University Press, Oxford, 21-32 p.
- 28)** Hawkins, D.S., Demers, G.W., Galloway, D.A.,1996, Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Research*, 56,892-8 p.
- 29)** Holst Hansen, C., Brünner, N., 1998, MTT cell proliferation assay, *Cell Biology, A Laboratory Handbook*, 16-18 p.
- 30)** Horakova, K., Sovcikova, A., Seemannova, Z., Syrova, D., Busanyova, K., Drobna, Z., Ferencik, M.,2001, Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants, *Free Radical Biology and Medicine*, 30. 650-64 p.
- 31)** Gomez-Lechon, J.V., *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, 1993, 6, 439-448, p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- 32)** Kagi, D., Vignau, F., Ledermann, B., et al., 1994, Fas and perforin pathways as major mechanisms of T-cell mediated cytotoxicity *Science*, 265, 528-530p.
- 33)** Karp, G., 1999, *Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments*. John Wiley and Sons Inc., New York, 123-231 p.
- 34)** Kılıçturgay, K., 2003, *İmmunoloji*, 191–198 s.
- 35)** Mason, RP., 1999, Calcium channel bolckers, apoptosis and cancer, Is there a biologic relationship , 34,1857–1866 p.
- 36)** Meyn, R.E., Stephens, L. C., Hunter, N. R., Milas, L., 1994, Induction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 33, 410–414 p.
- 37)** Minna, J.D., Mitchell, J.B., 1987, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, 47, 936–942 p.
- 38)** Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63 p.
- 39)** Mumcu E., 2005, Seydi Çayı Çevresinden Toplanan Su ve Toprak Örneklerinde Ames/Salmonella/Mutajenite Testi İle Bor Elementinin Mutajenitesinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- 40)** Murmu, N., Ghosh, P., Gomes, A., Mitra, S., Das, M., Besra, S.E., Majumdar, J., Bhattacharya, S., Sur, P., Vedasiromoni, J.R.,2002, Antineoplastic effect of new boron compounds against leukemic cell lines and cells from leukemic patients, *J. Exp. Clinical Cancer Research* Sep, 21 (3) 351–356 p.
- 41)** Murmu, N., Mitra, S., Das, M., Gomes, A., Vedasiromoni, J.R., Ghosh, M., Bhattacharya, M., Ghosh, P., Biswas, J., Bhattacharya, S, Sur, P.,2001, Boron compounds against human leukemic cells, Chittaranjan National Cancer Institute, Calcutta, India. *J.Exp.Clinical Cancer Research*, Dec;20 (3), 511-5 p.
- 42)** Müftüoğlu, E., 1995, *Klinik Hematoloji*, 363–365 s.
- 43)** Pan, H., Yin, C., Van Dyke, T., 1997, Apoptosis and Cancer Mechanisms, *Cancer Surveys* 29, 305–327 p.
- 44)** Ralston, N.V., Hunt, C.D.,2004, Transmembrane partitioning of boron and other elements in RAW 264.7 and HL60 cell cultures, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Grand Forks Human Nutrition Research Center, Grand Forks, *Biol Trace Elem Res*, 98(2),181-191 p.
- 45)** Reile, H. Birnbock H., Bernhardt, G., Spruss, T., Schonenberger, H., 1990, Computerized determination of growth kinetic curves and doubling times from cells in microculture. *Analytical Biochemistry*, 187,262–267 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- 46) Rianovi, G., Colston, K. W.,1999, Vitamin D analogues suppress IGF-1 signalling and promote apoptosis in breast cancer cells, European Journal of Cancer 35, 1717-1723 p.
- 47) Strum, B.S.,2003, Boron Fifth Element, Le Magazine November ,7-8 p.
- 48) Suarez C, Andreeff M, Miller DR, Steinherz PG, Melamed MM, 1985, DNA and RNA determination in 111 cases of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) by flow cytometry: correlation of FAB classification with DNA stemline and proliferation, Blood. 1980 Feb;55(2):282-93.
- 49) Şaylı, B.,2000, İnsan Sağlığı ve Bor Minarelleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi-Eti Holding Araştırma Projeleri 1
- 50) Şimşek, A.,Velioğlu, S.,2004,İnsan Sağlığı ve Beslenme Açısından Bor,Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi ,123-130s.
- 51) Tedone, T., Correale, M., Paradiso, A., Reshkin, S. J.,1996, Differential responsiveness of proliferation and cytokeratin release to stripped serum and oestrogen in the human breast cancer cell line, MCF-7, European Journal of Cancer 32A, 849-856 p.
- 52) Türkiye Klinikleri Hematoloji Dergisi., Hematolojik-Onkoloji Özel Sayısı, 2004., Cilt 2., 2-10 s.
- 53) Ulukaya, E., 2004, Apoptozis Ders Notları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı

13. EKLER DİZİSİ

EK-1	Dış Kapak
EK-2	İç Kapak

14. ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Zerrin Cantürk

Doğum tarihi ve yeri: 04.12.1976

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medeni Durumu: Evli

İletişim Adresleri: Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yunusemre Kampüsü 26470 Eskişehir, 0 222 335 05 81-3749.

Eğitim Durumu:

1993, Atatürk Lisesi, Eskişehir

1995, Osmangazi Üniversitesi SHMYO Tıbbi Laboratuvar Bölümü

2003, Dumlupınar Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil: İngilizce

Mesleki Deneyim:

1996–2004 Anadolu Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı

2004–2006 Osmangazi Üniversitesi Hematoloji Bölümü, Moleküler Hematoloji Laboratuvarı

2006–2007 Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yayımlar:

1) Akay M, Akın E, Cantürk Z, Gülbaş Z, "Aspirin Direnci-280 sağlıklı erişkini içeren prospektif bir çalışma" Türk Hematoloji Derneği 32.Ulusal Kongresi, Sözlü Bildiri, Vol. 23-3, Antalya, 08/11/2006.

2) Akay M, Kahraman Z, Gülbaş Z, "Imanitib Mesylate Causes Platelet Hypofunction in Chronic Myelocytic Leukemia Patients" Turkish Journal of Haematology, Vol.22,396, 2005.

- 3) Akay M, Gündüz E, Kahraman Z, Gülbaş Z, "Effects of various Therapeutic Regimens on Platelet Functions Patients with Myeloproliferative "Turkish Journal of Haematology, Vol.22,607, 2005.
- 4) Gündüz E, Cantürk Z, Gülbaş Z, "Thromboelastometry in Patients with idiopathic Thrombocytopenic Purpura" Turkish Journal of Haematology, Vol.22,359, 2005.
- 5) Akay M, Üsküdar D, Kahraman Z, Gülbaş Z. "Aspirin Resistance Frequency:Aprospective study of 175 healthy men"30.International Haematology Congress,Oral Presentation, 2005.
- 6) Akay M, Üstüner Z, Kahraman Z, "Kanserli Hastalarda Tromboelastografi ile Hiperkoagulabilitenin Değerlendirilmesi "Turkish Journal of Haematology, Vol.24, 2004.
- 7) Akay M, Mutlu F, Kahraman Z,Gülbaş Z, "Kronik Myeloproliferatif Bozukluklarda Trombosit Fonksiyonlarının Optik ve Luminesans Aggregasyon Yöntemi ile Karşılaştırılması" Turkish Journal of Haematology,Vol. 24, 2004.

Bilimsel Etkinlikler:

- 1) Osmangazi Üniversitesi Hematoloji Anabilim Dalı, The Leukemia and Lymphoma Training, (21-22/06/2005).
- 2) İstanbul Üniversitesi , Deneysel Tıp Araştırma Merkezi, 12.Uygulamalı Flow Sitometri Eğitimi, (26-30/06/2006).
- 3) İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı, Viroloji ve Temel İmmunoloji Bilim Dalı, Hücre Kültürleri Kursu, (30-31/03/2006).
- 4) Osmangazi Üniversitesi, TİCAM, Deney Hayvanları ile Araştırma Temel Eğitim Kursu, (3-4/-5/2007).
- 5) Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Laboratuar Akreditasyon Kursu, (10-11/05/2007).